

**Expressionsanalyse neuer putativer Onkogene und
Tumorsuppressorgene in Mammakarzinomen
und deren Auswirkung auf Zellen in Kultur nach ektopischer
Expression von cDNA**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades *doctor rerum naturalium*
(Dr. rer. nat.)

angefertigt an der Klinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe,
Funktionsbereich „Gynäkologische Molekularbiologie“
der Friedrich-Schiller- Universität Jena

vorgelegt dem Rat der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät
der Friedrich-Schiller-Universität Jena

von Dipl.-Biol. Susanne Grube

geboren am 16. 11. 1975 in Karl-Marx-Stadt

Zusammenfassung

Gynäkologische Karzinome, wie Brust-, Ovarial- und Endometriumkarzinome, gehören zu den häufigsten Krebserkrankungen bei Frauen in westlichen Industrieländern. Darunter ist Brustkrebs (Mammakarzinom) die am häufigsten diagnostizierte bösartige Erkrankung und eine führende Todesursache bei Frauen mittleren Alters. Mammakarzinome können in verschiedenen Formen und Stadien auftreten. Die häufigsten Formen sind duktale und lobuläre Mammakarzinome, welche aus Präkanzerosen (*Carcinoma in situ*) entstehen und sich über nicht invasive zu invasiven Stadien entwickeln. Es besteht ein großes Interesse genetische Veränderungen, welche zur Ausprägung von Brustkrebs führen, zu verstehen und neue Ansatzpunkte für frühzeitige Diagnostik und Therapien zu finden. Mit Hilfe von „*in silico*“-Analysen wurden mehr als 600 Gene identifiziert, deren Expression im Brust-, Ovarial- und Endometriumkarzinom deutlich von der Expression im entsprechenden Normalgewebe abweicht. In dieser Arbeit wurde die Expression von 15 ausgewählten putativen Tumorsuppressor- und fünf Onkogenen am Mammakarzinom untersucht. Das Ziel war, die vorausgegangenen „*in silico*“-Analysen experimentell mit Hilfe von cDNA-Dot-Blot-Hybridisierung und Echtzeit-PCR zu bestätigen. Nach Klonierung von ausgewählten Kandidatengenen wurden die Auswirkungen auf das klonale Wachstum, die Proliferationsgeschwindigkeit und die Invasivität von Mammakarzinomzelllinien analysiert.

Anhand der mit cDNA-Dot-Blot-Hybridisierung und Echtzeit-PCR gesammelten experimentellen Daten konnte ein Drittel der „*in silico*“ als differentiell transkribiert eingestuften Gene in ihrer Expression bestätigt werden. Als Kandidatengene für funktionelle Analysen wurden die reguliert exprimierte Gene ITIH5 (bn 22), Alpha-B-Crystallin (bn 39), PIGR (pct 56), capG (bt 11), 14-3-3 zeta (ot 59) und FABP5 (ot 89) ausgewählt.

ITIH5 ist ein zytoskelettstabilisierendes Protein, welches kovalent an Hyaluronsäure bindet. Wenn es in Tumoren nicht mehr exprimiert und sezerniert wird, wird die umgebende extrazelluläre Matrix instabil und der Tumor kann schneller wachsen. Außerdem können sich Tumorzellen leichter aus dem Verband lösen und andere Gewebe besiedeln. ITIH5 ist im Tumorgewebe deutlich geringer exprimiert als im Normalgewebe.

Alpha-B-Crystallin ist ein kleines Hitzeschockprotein und besitzt als Chaperon eine bedeutende Funktion im Schutz der zellulären Integrität vor stressbedingten Schädigungen. Alpha-B-Crystallin ist im Tumorgewebe deutlich geringer exprimiert als im Normalgewebe.

PIGR ist der Transporter für IgA aus den Basalzellen in das Lumen von Drüsen. Seine Expression im Tumorgewebe ist deutlich niedriger als in Normalgewebe.

CapG stabilisiert Aktinfilamente und beeinflusst die Bildung wichtiger Sekundärbotenstoffe. Damit reguliert es die Beweglichkeit von Zellen. Es ist im Tumorgewebe deutlich stärker exprimiert als im Normalgewebe.

14-3-3 zeta beeinflusst verschiedene Signaltransduktionswege in der Zelle. Seine Expression im Tumorgewebe ist deutlich höher als in Normalgewebe.

FABP5 spielt eine Rolle bei der fettsäurevermittelten Signaltransduktion, in Zellwachstum und Differenzierung. Es zeigt in einigen Fällen eine sehr stark erhöhte Expression im Tumor gegenüber Normalgewebe.

Es wurden Experimente zur Analyse von Invasivität, Proliferation und klonalem Wachstum nach ektopischer Expression verschiedener Kandidatengene in Mammakarzinomzelllinien durchgeführt. In der Proliferationsanalyse wurde eine Verringerung der Wachstumsgeschwindigkeit nach Transfektion von Mammakarzinomzelllinien mit ITIH5 gefunden. Für capG-transfizierte Zelllinien war eine erhöhte Wachstumsgeschwindigkeit zu beobachten. Bei der Analyse des klonalen Wachstums wurden für die Kandidatengene PIGR und Alpha-B-Crystallin verringerte Koloniezahlen gegenüber den Kontrollen gefunden. Im Invasionsassay reagierten nicht invasiven Zelllinien nach Transfektion mit capG mit invasivem Wachstum.

Aufgrund der durchgeführten Untersuchungen und Literaturrecherchen lässt sich für die veränderte Expression der Kandidatengene ITIH5, capG und FABP5 ein Zusammenhang mit Entstehung und Progression von Mammakarzinomen vermuten. Diese Annahme muß aber durch weitere Experimente bestätigt werden. Die Kandidatengene Alpha-B-Crystallin und PIGR scheinen keine Rolle in der Tumorgenese des Mammakarzinoms zu spielen. Da für das Kandidatengen 14-3-3 zeta zu wenig über mögliche Interaktionspartner bekannt ist, kann bei diesem Gen keine Aussage zur Relevanz in der Tumorgenese gemacht werden.

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	1
1.1	Ursachen der Tumorentstehung	1
1.2	Das Mammakarzinom	4
1.2.1	Veränderungen auf chromosomaler und genetischer Ebene beim Mammakarzinom	7
1.3	Die Grundlagen der vorliegenden Arbeit	13
1.4	Zielstellung der Arbeit	14
2	METHODEN	15
2.1	Validierung der Expression potentieller Tumorsuppressor- und Onkogene	15
2.1.1	Amplifikation der cDNA-Klone	15
2.1.2	Klonierung von Haushaltsgenen	16
2.1.3	cDNA-Dot-Blot	17
2.1.3.1	PCR an den cDNA-Klonen und Haushaltsgenen	17
2.1.3.2	Aufreinigung der PCR-Produkte	18
2.1.3.3	Bindung der PCR-Produkte an Membranen	18
2.1.3.4	Isolierung von geringen Mengen RNA aus Gewebeschnitten	19
2.1.3.5	Konzentrationsbestimmung von RNA aus Gewebeschnitten	19
2.1.3.6	DNase-Behandlung von RNA	19
2.1.3.7	Sondenmarkierung	20
2.1.3.8	Hybridisierung der cDNA-Dot-Blots mit radioaktiv markierter cDNA	20
2.1.4	Echtzeit-PCR	21
2.2	Klonierung ausgewählter Kandidatengene	22
2.2.1	Datenbankrecherchen	22
2.2.2	PCR	22
2.2.3	Klonierung	23
2.2.4	Sequenzierung	24
2.2.5	Midipräparation	24
2.3	Expression und Aufreinigung von rekombinanten Proteinen	25
2.3.1	Das Expressionssystem pET	25
2.3.2	Proteinexpression im analytischen Maßstab	25
2.3.3	Proteinexpression und Aufreinigung im präparativen Maßstab	27
2.3.4	Umpuffern und Konzentrierung von Proteinen	28
2.3.5	Konzentrationsbestimmung von Proteinen	28
2.4	Bestätigung der Expression ausgewählter Kandidatengene	29
2.4.1	RNA-RNA- <i>in situ</i> -Hybridisierung	29
2.4.1.1	Linearisierung der verwendeten Plasmid-DNA	29
2.4.1.2	In vitro-Transkription zur Sondenherstellung	29
2.4.1.3	Fixierung und Hybridisierung des Untersuchungsmaterials	30
2.4.2	Immunhistochemie an Gefrierschnitten	31
2.4.3	Immunfluoreszenz an kultivierten adhärenen Säugetierzellen	31
2.4.4	Northern-Blot zur Detektion von mRNA aus eukaryontischen Zellen	32
2.4.4.1	Isolierung von RNA aus adhärenen Zellkulturen	32
2.4.4.2	Northern-Blot	32
2.4.4.3	Sondenmarkierung	32
2.4.4.4	Hybridisierung	32

2.4.5	Western-Blot zur Detektion von Proteinen aus eukaryontischen Zellen	33
2.4.5.1	Isolierung von Proteinen aus adhärenenten Zellkulturen.....	33
2.4.5.2	Western-Blot.....	33
2.5	Funktionelle Analysen.....	34
2.5.1	Der Expressionsvektor pBK-CMVΔ	34
2.5.2	Kultivierung von adhärenenten Säugerzellen.....	34
2.5.3	Transfektion und Selektion von adhärenenten Säugerzellen.....	34
2.5.4	Invasionsanalyse.....	35
2.5.5	Proliferationsanalysen	36
2.5.5.1	Colorimetrische Bestimmung von Wachstumsraten	36
2.5.5.2	Analyse des klonalen Wachstums	37
3	ERGEBNISSE	38
3.1	Validierung der Expression potentieller Tumorsuppressor- und Onkogene	38
3.1.1	Bereitstellung der cDNA-Klone und Haushaltsgene	38
3.1.2	Bereitstellung der RNA aus Biopsiematerial.....	39
3.1.3	Untersuchung der Transkription mittels cDNA-Dot-Blot	41
3.1.4	Untersuchung der Transkription mittels Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion	43
3.1.5	Zusammenfassung der Ergebnisse aus cDNA-Dot-Blot und Echtzeit- PCR.....	46
3.2	Klonierung der sechs ausgewählten differentiell exprimierten Gene.....	46
3.2.1	Datenbankrecherchen	47
3.2.2	Amplifikation, Klonierung und Sequenzierung der sechs Kandidatengene	47
3.3	Untersuchung der Transkriptionsunterschiede der sechs ausgewählten Kandidatengene auf RNA-Ebene	49
3.3.1	RNA-RNA- <i>in situ</i> -Hybridisierung	49
3.3.2	Northern-Blot-Analysen zur Expression der Kandidatengene in gesunden Geweben	52
3.3.3	Expressionsanalysen an verschiedenen Mammakarzinomzelllinien	54
3.4	Untersuchung der Expression der sechs ausgewählten Kandidatengene auf Proteinebene	55
3.4.1	Expression rekombinanter Proteine.....	55
3.4.2	Immunhistochemische Untersuchungen.....	57
3.4.2.1	Nachweis der Spezifität der verwendeten Antikörper.....	57
3.4.2.2	Immunhistochemische Untersuchungen an Gewebeschnitten	58
3.5	Funktionelle Analysen.....	58
3.5.1	Invasionsassay	58
3.5.2	Proliferationsanalysen	60
4	DISKUSSION	64
4.1	Validierung der Expression potentieller Tumorsuppressor- und Onkogene	64
4.2	Das Kandidatengen ITIH5 (bn 22)	69
4.3	Das Kandidatengen Alpha-B-Crystallin (bn 39)	76
4.4	Das Kandidatengen PIGR (pct 56)	81
4.5	Das Kandidatengen capG (bt 11).....	86
4.6	Das Kandidatengen 14-3-3 zeta (ot 59).....	90

4.7	Das Kandidatengen FABP5 (ot 89)	93
5	ANHANG	I
5.1	Materialien	I
5.1.1	Chemikalien	I
5.1.2	Geräte	II
5.1.3	Software	III
5.1.4	Verbrauchsmaterial	III
5.1.5	Kits	IV
5.1.6	Enzyme	IV
5.1.7	Antikörper	IV
5.1.8	DNA-, RNA- und Proteinstandards	V
5.1.9	Lösungen und Kulturmedien	V
5.1.9.1	Kultivierung und Lagerung von Bakterien	V
5.1.9.2	Kultivierung von adhärenenten Säugetierzellen	V
5.1.9.3	Arbeiten mit DNA	VI
	Plasmidpräparation nach Birnboim	VI
	Gelelektrophorese	VII
	Sequenzierung	VII
	cDNA-Dot-Blot	VII
5.1.9.4	Arbeiten mit RNA	VIII
	RNA-Extraktion, Gelelektrophorese, Northern-Blot und Hybridisierung	VIII
	RNA-RNA-in situ-Hybridisierung	VIII
5.1.9.5	Arbeiten mit Proteinen	X
	Gelelektrophorese	X
	Aufreinigung von Proteinen	XI
	Western Blot	XI
	Immunhistochemie	XI
5.1.9.6	Zelllinien	XI
5.1.9.7	Bakterienstämme	XII
5.1.9.8	cDNA-Klone	XII
	Vektoren	XIV
5.1.9.9	Oligonukleotide	XVI
	Primer für cDNA Dot Blot und Echtzeit-PCR	XVI
	Klonierung	XVII
	Sequenzierung	XIX
	Reverse Transkription	XIX
5.1.9.10	Klinische Proben	XIX
5.2	Ergebnisse von Echtzeit-PCR und cDNA-Dot-Blot	XXIII
5.3	Abkürzungsverzeichnis	XXVII
5.4	Literaturverzeichnis	XXXI
5.5	Danksagung	XXXVIII
5.6	Lebenslauf	XXXIX
5.7	Ehrenwörtliche Erklärung	XL

1 Einleitung

1.1 Ursachen der Tumorentstehung

Die Entstehung von Tumoren ist ein mehrstufiger Prozess, der durch die Anhäufung von Mutationen in dereguliert wachsenden Zellklonen verursacht wird (Vogelstein & Kinzler, 1993). Normalerweise unterliegen Zellteilung, Differenzierung und Apoptose genauen homöostatischen Kontrollmechanismen, deren molekulare Grundlagen evolutionär konservierte Signalkaskaden sind. In neoplastischem Gewebe ist die Homöostase zu Ungunsten von Differenzierung und Apoptose in Richtung Proliferation verschoben und der Tod von Zellen durch Apoptose möglicherweise blockiert (Franks & Teich, 1997). Dies führt zu ungehemmter Zellproliferation und Immortalität und damit zur Bildung von Tumoren. Voraussetzung für die Verschiebung der Homöostase ist eine Erhöhung der Mutationswahrscheinlichkeit. Dies kann durch eine erhöhte Zellzahl und durch eine Erhöhung der Mutationsrate geschehen. Eine mögliche Erklärung für die Erhöhung der Zellzahl bietet das klonale Modell der Tumorentstehung (Nowell, 1976, Abb. 1).

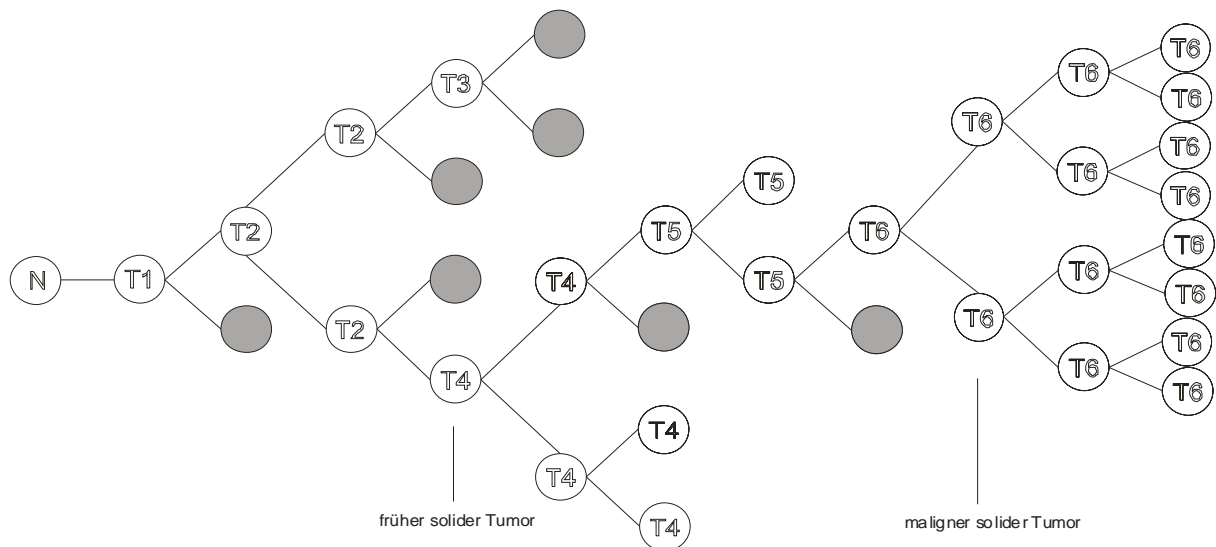


Abbildung 1: Modell der klonalen Evolution maligner Tumoren (nach Nowell, 1976). Eine normale Zelle (N) erwirbt durch Mutation einen geringfügigen Wachstumsvorteil. Diese Zelle expandiert daraufhin zu einem Zellklon (T1). Dann kommt es in einer der Zellen dieses Klon zu einer weiteren Mutation, die einen neuen Wachstumsvorteil hervorbringt. Auch daraus kann wieder ein Zellklon (T2) wachsen. Dies wiederholt sich mehrfach bis zur Etablierung eines malignen Tumors (T6). Einige der Zellklone sind nicht überlebensfähig oder werden durch Kontrollmechanismen des Wirts eliminiert (grau).

Die Erhöhung der Zellzahl allein ist nicht ausreichend, um die Mutationsrate in proliferierenden Zellklonen genügend zu steigern. Deshalb wurde ein primärer Defekt, bezeichnet als „Mutator-Phänotyp“, postuliert, der eine genomische Instabilität verursacht (Loeb, 1998).

Fundamentale Änderungen der Zellphysiologie, die das maligne Wachstum erlauben (Hanahan & Weinberg, 2000), liegen allen Tumoren zugrunde. Entscheidende Eigenschaften, die Tumore vom gesunden Gewebsverband unterscheiden, sind die Autonomie von wachstumsstimulierenden Signalen, die verminderte Empfindlichkeit gegenüber wachstumshemmenden Signalen und die Unterdrückung des programmierten Zelltodes (Apoptose). Außerdem gehören das unbegrenzte replikative Potential, die Stimulation der Angiogenese und die Fähigkeit zu Gewebeinvasion und Metastasierung zu den Eigenschaften von Tumorzellen.

Eine initiale Veränderung für die Transformation der normalen Zelle zur Krebszelle ist die Zerstörung des komplexen Netzwerkes von Reparaturmechanismen, durch welches DNA-Schädigungen behoben werden. In Tumorzellen werden vermehrt chromosomale Instabilitäten, eine erhöhte spontane Mutationsrate und Änderungen im Methylierungsmuster der DNA beobachtet, die zu weiteren Veränderungen innerhalb der Zelle beitragen. Unter diesen Voraussetzungen kann die Entstehung von Tumorgenen erfolgen. Alle Gene, die an der Entstehung und Progression maligner Tumoren beteiligt sind, lassen sich als Tumorgene bezeichnen (Knudson, 1993). Dazu zählen die Onkogene als aktivierte proliferationsfördernde Signalmoleküle und die Tumorsuppressorgene, inaktivierte proliferationshemmende Moleküle. Die betroffenen Gene können sich je nach Tumortyp unterscheiden. Ihre funktionellen Eigenschaften führen jedoch immer zu einem veränderten Phänotyp, in welchem sie zur Wirkung kommen und letztendlich einen Grund für die Selektion der Tumorzellen darstellen (Tomlinson & Bodmer, 1999).

Die bei der Entstehung von Onkogenen am häufigsten zu beobachtenden Ereignisse stellen chromosomale Translokationen und Deletionen dar (Mitelman et al., 1997). Dadurch können Gene, deren kodierende Sequenzen nicht verändert sind, unter dem Einfluss regulatorischer Sequenzen anderer Gene verstärkt oder auf andere Weise nicht korrekt exprimiert werden. Außerdem kann es zur Bildung neuer Genprodukte durch Fusion kodierender Sequenzen verschiedener Chromosomen kommen. Die entstandenen Hybrid-mRNAs können für funktionsfähige Fusionsproteine mit veränderten funktionellen Eigenschaften kodieren, welche den malignen Phänotyp beeinflussen können (Rabbitts, 1994). Bei Genamplifikationen kommt es durch die höhere verfügbare Kopienzahl zu verstärkter Expression und damit einem Einfluss auf die maligne Transformation. Ein weiterer bedeutender Mechanismus für die Aktivierung von Onkogenen sind Punktmutationen, die häufig durch mutagene Karzinogene ausgelöst werden. Hier wird eine hohe Selektivität und Spezifität bei den auftretenden Mutationen beobachtet, deren Ursache im Wirkungsmechanismus der Karzino-

gene, dem onkogenen Potential von Basenposition und -austausch sowie der Fehlerrate von DNA-Reparaturmechanismen liegt (Bos, 1989).

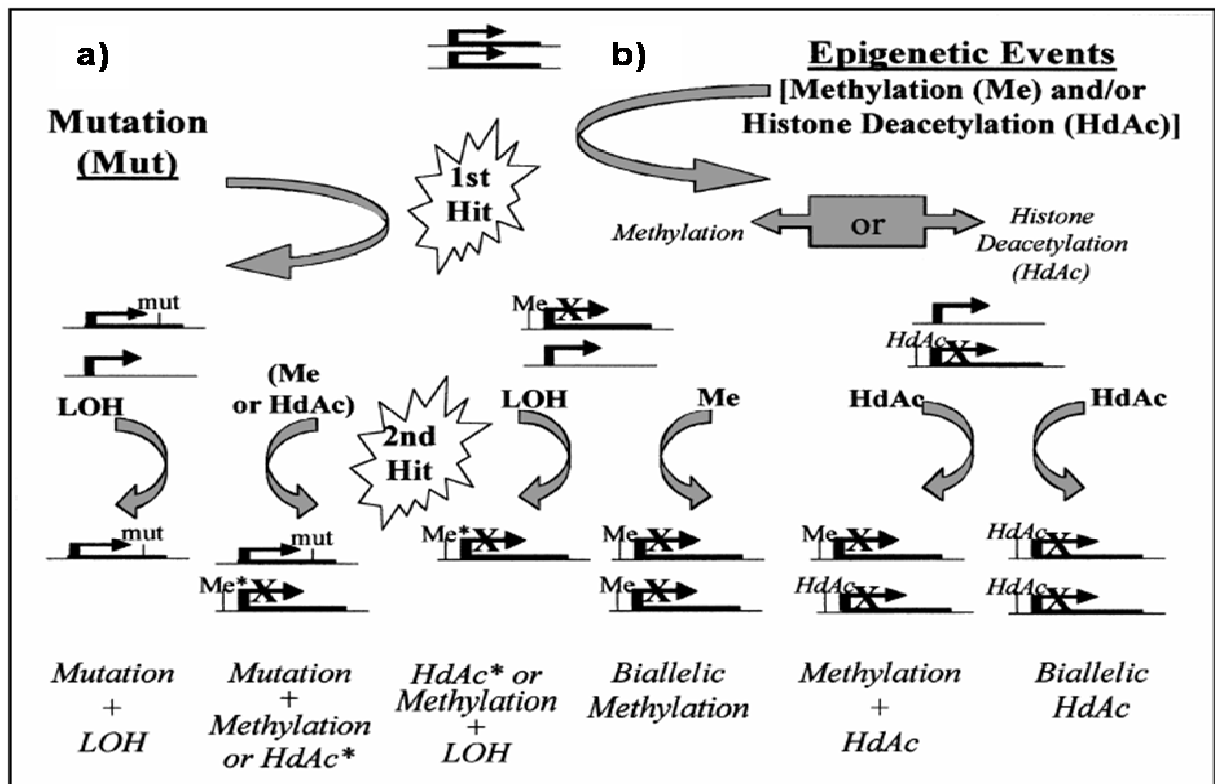


Abbildung 2: Erweitertes „two hit“-Modell der Tumorentstehung nach Knudson. Die Pfeile markieren zwei aktive Allele eines Tumorsuppressorgens. a) „two hit“-Hypothese von Knudson 1975: Durch eine Mutation wird ein Allel zerstört, was zu einem Verlust der Heterozygotie führt. In einem speziellen Fall kann es dann zu einer weiteren inaktivierenden Mutation im zweiten Allel kommen. b) Darstellung weiterer epigenetischer Veränderungen nach Mielnicki et al. 2001: DNA-Hypermethylierung (Me) oder Histondeacetylierung (HdAc) können als erstes oder zweites Ereignis die Inaktivierung eines Allels verursachen. Es kann aber auch vorkommen, dass eine der beiden epigenetischen Ursachen beide Allele betrifft. Die funktionelle Konsequenz der Kombination dieser strukturellen Veränderungen in beiden Allelen ist die Inaktivierung eines Tumorsuppressorgens. Entnommen aus Mielnicki et al. 2001.

Bei den Tumorsuppressorgenen kommt es durch Inaktivierung von bestimmten Genen zur Etablierung eines malignen Phänotyps. Hier müssen immer beide Allele des Gens betroffen sein. Ursache für eine Geninaktivierung kann der Verlust von Chromosomen oder Teilen von Chromosomen sein. Weiterhin kommt es durch illegitime Rekombinationen und Deletionen im entsprechenden Locus zur Inaktivierung von Genen. Außerdem kann die Prozessierung der RNA durch Mutationen, welche Leserasterverschiebungen verursachen oder ein Stoppkodon einfügen, gestört sein (Lemoine, 1997). Auch die Promotorregionen von Genen können von Inaktivierungsmechanismen betroffen sein. Dazu gehören Mutationen und epigenetische Prozesse wie DNA-Hypermethylierungen und Histondeacetylierungen (Abb. 2).

1.2 Das Mammakarzinom

Die erwachsene weibliche Brust besteht aus epithelialen Komponenten und Stroma (Abb. 3). Zu den epithelialen Anteilen zählen die Acini mit ihren Ausführungsgängen, welche in Lobuli gebündelt sind und in intralobuläre, dann extralobuläre Dukti münden. Die Dukti führen über 15-20 Milchgänge zur Mamille.

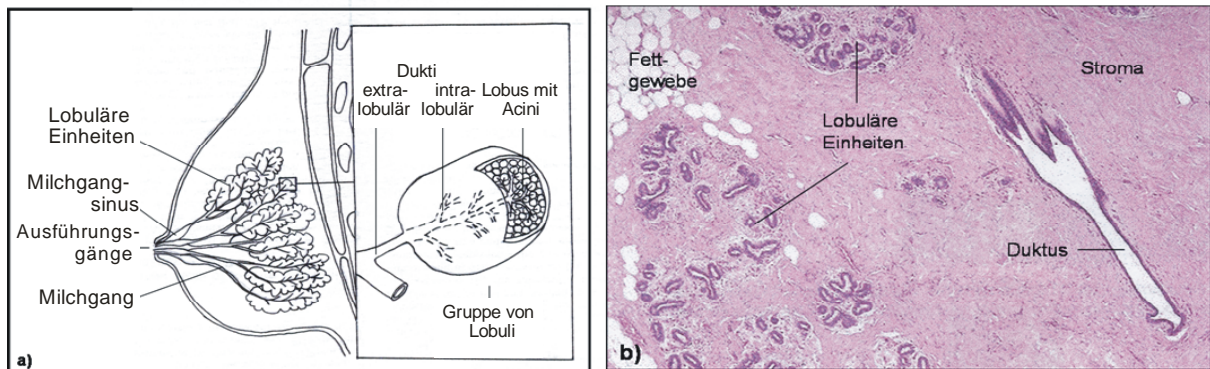


Abbildung 3: Schematische Darstellung a) und Histologie b) der Anatomie der gesunden Brust der erwachsenen Frau. Abbildung modifiziert nach Hayes, 1991.

Es treten verschiedene gutartige (benigne) Veränderungen der Epithelien der weiblichen Brust auf. Dazu gehören fibrozystische Mastopathie, Fibroadenome und Papillome. Außerdem gibt es maligne (bösartige) Veränderungen, die als Brustkrebs (Mammakarzinom) bezeichnet werden. Mammakarzinome können in verschiedenen Formen und Stadien auftreten. Die häufigsten Formen sind duktale und lobuläre Mammakarzinome, welche aus Präkanzerosen (*Carcinoma in situ*) entstehen und sich über nicht invasive zu invasiven Stadien entwickeln.

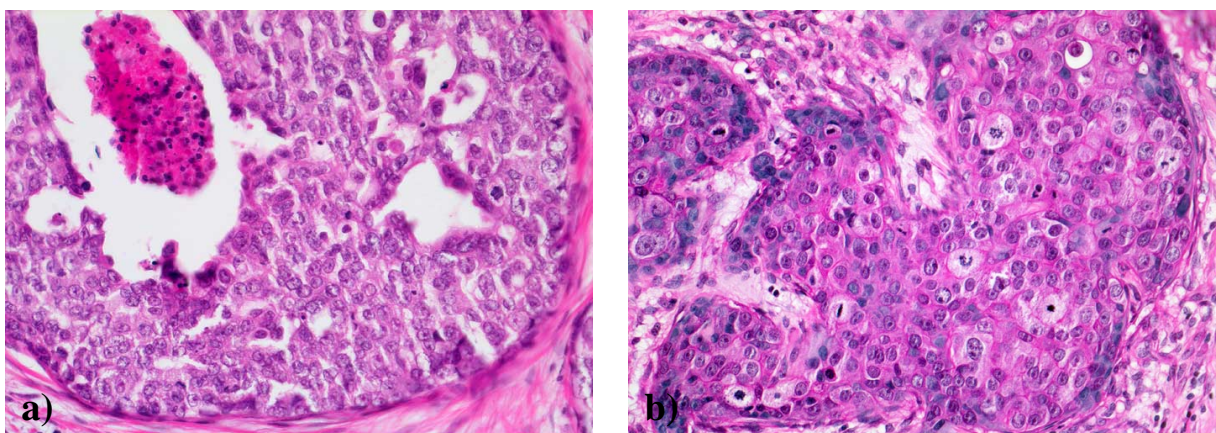


Abbildung 4: Duktales *Carcinoma in situ* (hochgradig), mit Komedonekrose a) und gering differenziertes invasives duktales Karzinom b). Mikrophotogramm, HE, Vergrößerung 100fach Abbildung aus PathoPic.

Das duktales *Carcinoma in situ* (DCIS) ist eine Vorläuferläsion, die in drei bis sechs Prozent aller Brustkrebsfälle diagnostiziert wird. DCIS entsteht in den kleinumigen duktulo-lobulären Segmenten, dabei bleibt die umgebende Basalmembran intakt. Aus dem DCIS entwickelt sich das invasive duktales Karzinom durch Einbruch von Tumorzellen in das umliegende Stroma. Es ist die häufigste Form des invasiven Brustkrebses, welche bei 60-65% aller Patientinnen diagnostiziert wird (Abb. 4). Zurzeit wird das folgende Modell der schrittweisen Karzinogenese für duktales Brusttumoren diskutiert (Abb. 5).

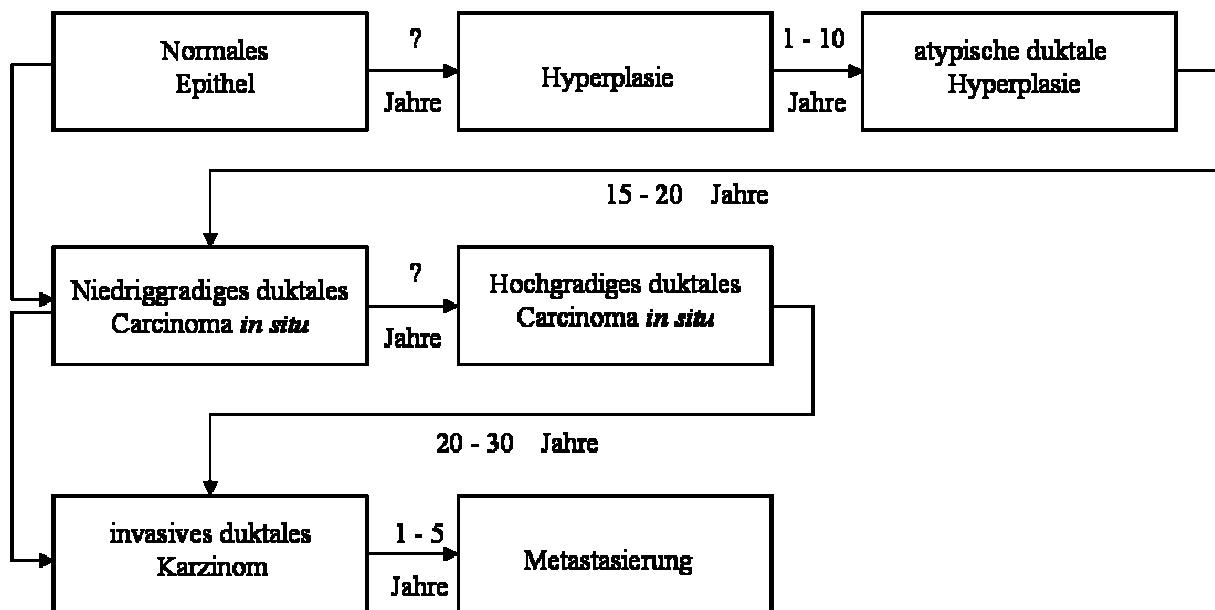


Abbildung 5: Modell der schrittweisen Karzinogenese für duktales Brusttumoren. Abbildung modifiziert nach Russo et al., 1998.

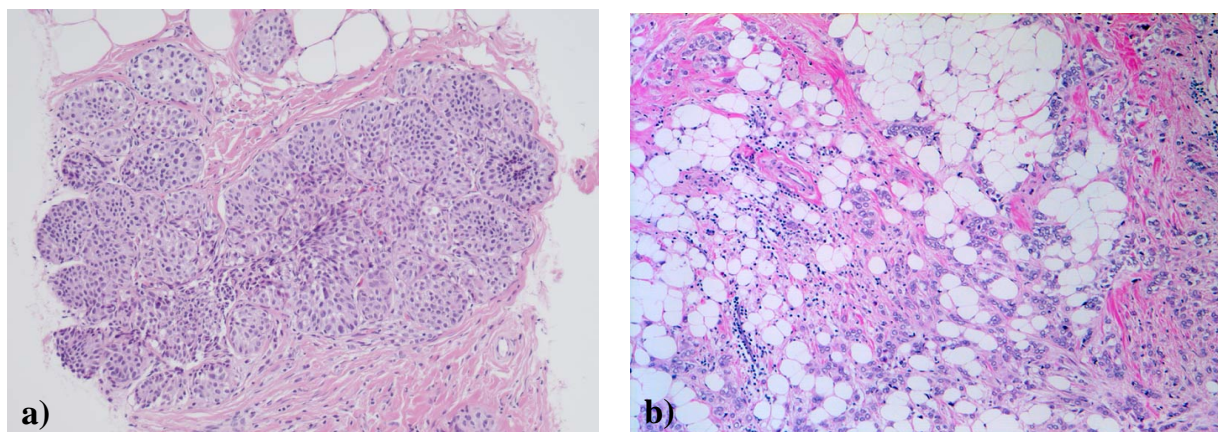


Abbildung 6: Lobuläres *Carcinoma in situ* a) und invasives lobuläres Karzinom b). Mikrophotogramm, HE, Vergrößerung 100fach Abbildung aus PathoPic.

Seltener, in 10-20% aller Fälle, kommt das lobuläre *Carcinoma in situ* vor, das sich zu einem lobulären invasiven Karzinom entwickeln kann (Abb. 6). Es existieren weitere Subtypen des Mammakarzinoms, welche aber sehr selten auftreten.

Nachdem der Tumortypus identifiziert ist, werden alle Tumoren einer weiteren pathologischen Klassifizierung nach dem TNM-System (T = Tumorausdehnung, N = Nodalstatus, M = Fernmetastasen, UICC, 1997) unterworfen. Außerdem werden die Tumore zur Beurteilung morphologischer Kriterien einem histologischen Grading unterzogen (Elston & Ellis, 1991): Grad 1 Tumore sind hoch differenziert und werden in 20% aller Fälle diagnostiziert, intermediär differenzierte Grad 2 Tumore kommen in 65% und gering differenzierte Grad 3 Tumore in 15% aller Fälle vor.

Brustkrebs ist die am häufigsten diagnostizierte bösartige Erkrankung bei Frauen in westlichen Industrieländern und eine führende Todesursache bei Frauen mittleren Alters. Weltweit sind jährlich ca. eine Million Frauen von dieser Krankheit betroffen (Ferlay et al., 2000). An dieser Krankheit sterben 35% der brustkrebskranken Frauen. Allein in Deutschland erkranken jährlich über 47.500 Frauen an Brustkrebs (Arbeitsgemeinschaft Bevölkerungsbezogener Krebsregister in Deutschland, 2004). Die relative 5-Jahres-Überlebensrate für Brustkrebspatientinnen liegt hier zurzeit bei 76%.

Risikofaktoren für die Entstehung von Brustkrebs sind Kinderlosigkeit, Alter über 27-30 Jahre bei der ersten Geburt, eine familiäre Belastung (erkrankte Mutter oder Schwester) und Übergewicht. Benigne Brusterkrankungen, ein höheres Alter beim Eintreten der Wechseljahre sowie Hormonersatztherapien in den Wechseljahren sind ebenfalls mit einem erhöhten Risiko für Brustkrebs assoziiert (Nayfield et al., 1991).

Der familiären Belastung kommt eine große Bedeutung als Risikofaktor zu. Fünf bis zehn Prozent aller Brustkrebsfälle sind Patientinnen mit erblichem Brustkrebs (Hofmann W & Schlag PM, 2000). Ist ein Familienmitglied von Brustkrebs betroffen, steigt das Risiko, ebenfalls zu erkranken, auf das 2,6 bis 2,8fache, bei zwei betroffenen Familienmitgliedern auf das 4,2 bis 6,8fache (Nayfield et al., 1991). Ursache für die meisten erblichen Fälle von Brustkrebs sind Mutationen in den Tumorsuppressorgenen BRCA1 und BRCA2. Andere krebsauslösende Mutationen finden sich in TP53, PTEN, MSH2, MLH1 und STK1. Bei erblichem Brustkrebs sind bereits Mutationen eines Allels in der Keimbahn vorhanden. Bei 52% der Familien mit erblichem Brustkrebs wurden Mutationen in BRCA1 und bei 32 % Mutationen in BRCA2 gefunden. Im Gegensatz zum erblichen Brustkrebs treten die übrigen 90 bis 95% der Erkrankung sporadisch auf. Das sporadische Mammakarzinom tritt als Folge einer Ansammlung von somatischen Mutationen auf, nicht durch Mutationen in der

Keimbahn (Kenemans et al., 2004). Ein frühes Ereignis in der Karzinogenese ist hier die Aktivierung von Onkogenen, dazu gehören MYC, CyclinD1 und ERBB2. Danach kommt es zu Mutationen in fünf bis sechs weiteren Genen, was schließlich zur Entwicklung von Tumorzellen führt.

Brustkrebs ist in seinem klinischen und histopathologischen Erscheinungsbild sehr heterogen, die Prognose und die Behandlungsformen beruhen stark auf dem Typus des Tumors und dem Zeitpunkt der Diagnose. Etablierte prognostische Faktoren sind das TNM-System, das Alter, Expression des Östrogenrezeptors sowie die Beteiligung regionaler Lymphknoten. Aufgrund verbesserter Vorsorgeuntersuchungen werden zurzeit ca. 50% der Brustkrebsfälle diagnostiziert, bevor Lymphknoten befallen sind. In diesem frühen Erkrankungsstadium können 70% der Patientinnen allein durch Operation geheilt werden. Trotzdem erleiden immer noch 30% der Patientinnen einen Rückfall und sterben. Obwohl nur 10% der Patientinnen mit primärem Brustkrebs klinisch-pathologische Anzeichen für Metastasierung zeigen, entwickelt ungefähr die Hälfte von ihnen innerhalb von fünf Jahren nach Entfernung des Primärtumors Metastasen. Selbst bei Frauen mit frühen Stadien von Brustkrebs muss ein Drittel mit Rückfällen rechnen. Es gibt zahlreiche Hinweise darauf, dass die genetischen Voraussetzungen für eine Metastasierung in einem sehr frühen Entwicklungsstadium des Tumors festgelegt werden, wobei Tumorentwicklung und Metastasierung nicht auf denselben genetischen Grundlagen beruhen müssen (Fidler & Radinsky, 1990). Aus diesem Grund besteht ein hoher Bedarf, weitere prognostische Marker für Brustkrebsentstehung und -metastasierung zu finden. Damit könnten Patientinnen mit hohem Rückfallrisiko frühzeitig erkannt werden. Außerdem wäre es möglich eine spezifischere adjuvante hormonale Therapie bzw. Chemotherapie durchzuführen.

1.2.1 Veränderungen auf chromosomaler und genetischer Ebene beim Mammakarzinom

Es gibt verschiedene Hinweise darauf, dass das Fortschreiten der Brustkrebserkrankung mit der Anhäufung genetischer Veränderungen einhergeht, und dass spezifische histologische Subtypen aufgrund bestimmter molekularer Veränderungen entstehen. Eine geringe Anzahl genetischer Veränderungen wurde beim Mammakarzinom bereits in hyperplastischem Epithel gefunden. Dazu gehören karyotypische Anomalien, erhöhte Wachstumsraten und Veränderungen in Zell-Zell-Interaktionen. Auf genetischer Ebene konnten die Überexpression von Onkogenen wie zum Beispiel ERBB-2, eine Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen wie TP53, eine verstärkte Expression des Östrogenrezeptors und Telomeraseaktivität

gefunden werden (Stampfer & Yaswen, 2000). Diese Befunde lassen auf eine Beteiligung der Hyperplasien bei der Bildung prämaligener Vorläuferläsionen schließen, da die gleichen genetischen Veränderungen auch in malignen Brusterkrankungen gefunden werden. Gewebe von atypischen duktalem Hyperplasien weist weitere genetische Veränderungen auf. Schließlich zeigen hochgradige DCIS und invasive duktales Karzinome einen hohen Grad an Übereinstimmung in ihren genetischen Defekten. Bisher wurde jedoch noch kein zuverlässiges Modell für die molekulare Pathogenese und die molekulare Typisierung von Brusttumoren entwickelt. Detaillierte Informationen über brustkrebspezifische Gen-Netzwerke könnten zur Entwicklung solcher Modelle beitragen und damit zu einem besseren Verständnis der Karzinogenese von Brusttumoren führen. Das würde letztendlich neue prognostische Marker und potentielle Zielmoleküle für neue therapeutische Ansätze mit sich bringen.

Es existieren verschiedene Mausmodelle für intraepitheliale Neoplasien der Brust und für frühe Präkanzerosen (Cardiff et al. 2000). Daran kann die schrittweise Karzinogenese gut untersucht werden, da sie zu humanen Neoplasien und Präkanzerosen morphologisch sehr ähnlich sind. Es ist möglich, in immundefiziente Mäuse Brustgewebe zu transplantieren. Dafür können gesundes Gewebe, Präkanzerosen und Tumorgewebe verwendet werden. Es ist aber auch möglich Zelllinien zu transplantieren, welche unter Umständen mit einzelnen zu untersuchenden Genen transformiert wurden. An diesen transplantierten Mäusen lässt sich untersuchen, ob die eingebrachten Zellen einen Tumor oder Metastasen bilden können (Miller 2000). Von Stampfer und Kollegen (Stampfer & Yaswen, 2000) wurden Kulturmodelle zur Transformation von humanen Brustepithelzellen entwickelt. Ihre Bedeutung liegt in der Verwendung von gesunden Epithelzellen der Brust, die in Kultur durch Transfektion genetisch verändert werden können. Außerdem existieren einige Brustkrebszelllinien, wie MCF7, SKBR3 und EFM-19 die aus Pleuraergüssen von Patientinnen mit Mammakarzinomen gewonnen wurden. An diesen Zelllinien können nach Transfektion zu untersuchender Gene verschiedenste Experimente durchgeführt werden.

Zur Analyse der Karzinogenese existieren sehr viele Methoden. Zytogenetische Abnormalitäten werden mit Karyotypanalysen und Durchflusszytometrie untersucht. Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung (FISH) erlaubt die Suche nach Verlusten oder Zugewinnen von DNA an Chromosomen in der Metaphase und der Interphase. Mit Hilfe der Komparativen Genomischen Hybridisierung (CGH) wird nach DNA-Verlusten oder -Zugewinnen in extrahierter genomischer DNA gesucht. Die Analyse von Mikrosatelliten (LOH-Analyse) zeigt allelische Imbalancen in kleinen repetitiven DNA-Sequenzen (Mikrosatelliten) und kann

damit den Verlust von Allelen und die mögliche resultierende Inaktivierung von Genen in der Nähe der Mikrosatelliten anzeigen. Mit zusätzlichen Untersuchungsmethoden lassen sich dann die Regionen eines Verlustes oder Zugewinns von DNA näher eingrenzen. Es ist möglich damit einzelne betroffene Gene zu finden. Auf der RNA- und Proteinebene kann eine gesenkte oder erhöhte Genexpression mit verschiedenen (semi)quantitativen Methoden untersucht werden. Dazu gehören zur RNA-Analyse die subtraktive Hybridisierung, Echtzeit-PCR und Makro- sowie Mikroarrays. Zur Quantifizierung von Proteinen aus verschiedenen Geweben kann zum Beispiel ein Immunblot, ein direkter ELISA oder die 2-D-Gelelektrophorese verwendet werden. Mit Hilfe der Sequenzierung können Mutationen detektiert werden, welche ebenfalls für die Inaktivierung von Genen verantwortlich sein können.

Umfangreiche LOH-Analysen in sporadischen Brusttumoren führten zur Identifizierung von putativen Tumorsuppressorgenen in verschiedenen chromosomalen Regionen. Es konnten bereits einige Korrelationen zwischen chromosomalen Verlusten in bestimmten Regionen und Merkmalen des Tumors festgestellt werden. So korreliert LOH auf Chromosom 16q24 zum Beispiel mit einer günstigen Prognose und LOH auf Chromosom 17p13.3 und 17q11-12 (Plummer et al., 1997; Schmutzler et al., 1996) mit Grad 3 Tumoren. Der LOH auf Chromosom 11p und 11q (Kamik et al., 1998; Lichy et al., 1998 Laake et al., 1997; Schmutzler et al., 1996) korreliert mit Tumorgröße und Progression.

Es wurden außerdem Studien zur Amplifikation von chromosomalen Regionen und damit zum Nachweis potentieller Onkogene durchgeführt. Neuere Studien haben gezeigt, dass Onkogene meist einzeln amplifiziert werden, manchmal aber auch in langen Amplikons, die sehr hohe Zahlen an Genen enthalten, vorkommen. Die detaillierte Analyse dieser Amplikons hat gezeigt, dass sie eine hohe Anzahl von Kandidatenonkogenen für Brustkrebs enthalten. Beispiele hierfür sind das HER-2-Amplikon auf Chromosom 17q12-21 und das 17q22-24-Amplikon, welches die Onkogene RPS6KB1, TBX-2 und PPM1D enthält (Sinclair et al., 2003; Courjal et al., 1997).

Diese Daten lassen vermuten, dass spezifische genetische Veränderungen den Phänotyp und das biologische Verhalten von Tumoren bestimmen oder zumindest dazu beitragen. Kürzlich erschienene Arbeiten weisen darauf hin, dass epigenetische Vorgänge wie DNA-Hypermethylierung und Histondeacetylierung zu einer transkriptionellen Abschaltung von Tumorsuppressorgenen führen können. Im humanen Genom gibt es ungefähr 45000 CpG-Inseln. In normalen Zellen sind diese generell unmethyliert (Mielnicki et al., 1999). Eine Hypermethylierung von CpG-Dinukleotiden in Promotor- und/oder Intronsequenzen von

Genen ist mit transkriptioneller Repression verbunden. Bei vielen Untersuchungen an Brustkrebs wurde gefunden, dass transkriptionelle Repression durch *de novo* DNA-Methylierung Einfluss auf Tumorsuppressorgen-Loci wie p16, p21WAF, E-Cadherin und BRCA1 hat. Es gibt zunehmend Hinweise, dass die DNA-Hypermethylierung in einzelnen Genen kein singulärer Vorgang ist, sondern vielmehr eine weiträumige Hypermethylierung von CpG-Inseln in bestimmten Tumoren widerspiegelt. Dies könnte zu einer klonalen Selektion solcher hypermethylierter Zellen führen.

Der transkriptionelle Status ist außerdem eng mit Änderungen in der Histonacetylierung verknüpft. Histone in transkriptionell aktivem Chromatin sind immer hyperacetyliert, wobei Histone in transkriptionell inaktivem Chromatin größtenteils hypoacetyliert sind (Wolffe et al., 2000).

Es gibt zahlreiche Studien über Veränderungen an einzelnen Genen beim Mammakarzinom und die Funktion dieser Gene als prognostischer Marker und mögliches Therapieziel. Einige Beispiele sind im Folgenden aufgeführt.

Ungefähr 70 bis 80% aller Brusttumore exprimieren die α -Untereinheit des Östrogenrezeptors (ER). Diese Tumoren tendieren zu langsamerem Wachstum, haben einen höheren Differenzierungsgrad und sind mit einer allgemein besseren Prognose assoziiert als Tumore, die keinen Östrogenrezeptor exprimieren. Aus diesem Grund ist die Expression des ER- α einer der wenigen manifestierten prognostischen Faktoren. Nach Aktivierung durch Östrogen binden die Dimere des ER an so genannte Östrogenantwortelemente (ERE), welche innerhalb der Promotoren vieler Gene gefunden werden (Keen & Davidson, 2003). Die Erhöhung der ER- α -Expression ist bereits in frühen dukталen Hyperplasien nachweisbar. Von großer Bedeutung ist, dass die Expression des ER- α in Brustkrebszellen einen wichtigen Indikator für die positive Reaktion auf eine endokrine Therapie durch Entfernung des Liganden Östrogen darstellt. Die Therapie resultiert in einer Verringerung der Tumorgroße, einem Anstieg der Zellen in der S-Phase und induziert Marker der zellulären Apoptose (Fisher et al., 1998).

Die drei Untereinheiten des Retinolsäurerezeptors (RAR- α , RAR- β und RAR- γ) werden in normalem epithelialen Brustgewebe sehr stark exprimiert (Keen & Davidson, 2003). Sie sind ligandenaktivierte Rezeptoren, die die Transkription von Genen durch Interaktion mit Retinolsäureantwortelementen (RARE) regulieren, die in vielen Genpromotorregionen gefunden werden. Aktivierte Retinolsäurerezeptoren bilden außerdem Homo- oder Heterodimere mit den Retinol-X-Rezeptoren (RXR- α , RXR- β und RXR- γ). Sie funktionieren als Tumorsuppressorgene, welche die Proliferation inhibieren und durch Arrest in der G1-S-

Phase des Zellzyklus Zelldifferenzierung und Apoptose induzieren. Die Expression von RAR- β in normalen epithelialen Brustzellen ist hoch, wird aber in malignen Tumoren in Transkription und Translation herunter reguliert. In primären Mammakarzinomen wird oft ein Verlust der Heterozygosität in Region 3p24, der chromosomalen Region, die für RAR- β kodiert, gefunden.

Die Familie des Epidermalen Wachstumsfaktor Rezeptors (EGFR) ist Mitglied der Rezeptortyrosinkinasen- (RTK) Superfamilie (Keen & Davidson, 2003). Sie hat vier Mitglieder, von denen das HER-2/neu/erbB2-Protein für die Mammakarzinogenese von Bedeutung ist. Die Aktivierung der HER-Proteine erfolgt über Ligandenbindung. Es gibt bisher 25 bekannte Liganden (Olayioye et al., 2000). Das HER-2/neu/erbB2-Protein ist in ungefähr 25% der invasiven Brusttumoren überexprimiert, meist durch Genamplifikation. HER-2-Überexpression korreliert mit einer schlechten Prognose, aber nicht mit Tumorgroße, Grad der Differenzierung oder dem metastatischen Potential. Aufgrund der häufigen HER-2-Überexpression wurde großes Interesse darauf verwendet, Therapien, die die HER-Familie treffen, zu entwickeln. Zwei der untersuchten Medikamente sind ZD1839 (Iressa) und Trastuzumab (Herceptin). ZD1839 führt zu einer Hemmung der Proliferation und Induktion der Apoptose. Trastuzumab ist ein monoklonaler Antikörper, der gegen die Ektodomäne von HER-2 gerichtet ist. Er blockiert die Zellproliferation, inhibiert Wachstum von Zellen und induziert Apoptose in Brustkrebszellen.

Somatische Mutationen in dem Kernphosphoprotein p53 werden in ungefähr 20-30% der primären Mammakarzinome beobachtet (Keen & Davidson, 2003). Sie lokalisieren in einer der konservierten Kerndomänen und resultieren in geringerer DNA-Bindungsaffinität und Gentransaktivierung. Tumore mit p53-Mutationen sind hoch invasive, schlecht differenzierte hochgradige Brusttumoren. Es gibt einige untersuchte Fälle, bei denen in primären Karzinomen und im dazugehörigen DCIS p53-Mutationen gefunden wurden. In Hyperplasien konnten bisher keine Mutationen nachgewiesen werden.

Januskinasen/STATs sind wichtige Regulatoren der Entwicklung des Brustgewebes und der Karzinogenese. STATs sind Transkriptionsfaktoren, die durch eine große Zahl extrazellulärer Stimuli wie Wachstumsfaktoren und Zytokine aktiviert werden können (Shen & Brown, 2003). Im Vergleich von tumorfreien Geweben mit primären Brusttumoren findet man in den Tumoren eine erhöhte Expression von STATs. Auch viele andere Mitglieder von Transkriptionsfaktorfamilien sind in Brusttumoren überexprimiert. Dazu gehören zum Beispiel die Homeoboxgene HOXB7, das in 10,2% der primären Mammakarzinome herauf reguliert ist, und SIX1, welches in 44% der primären Karzinome und 90% der untersuchten Metastasen

herauf reguliert ist (Coletta et al., 2004). Diese frühe Deregulation von Genen, die an der Regulation von Zellzyklusprogression und Proliferation beteiligt sind, ist charakteristisch für die Karzinogenese.

Telomeraseaktivität wurde bei verschiedenen Untersuchungen in prämaligen Brustkrankungen gefunden (Shpitz, et al., 1999) und ebenfalls in den untersuchten DCIS. Daraus lässt sich schließen, dass die Aktivierung der Telomerase einen frühen Schritt in der Brustkarzinogenese darstellt.

Das Aktinfilament-bindende Protein Gelsolin, ein wichtiger Regulator der Länge von Aktinfilamenten mit Bedeutung für die Beweglichkeit von Zellen, ist in 70 % der untersuchten invasiven Mammakarzinome herunter reguliert (Asch et al., 1996). Der Expressionsverlust wird durch epigenetische Mechanismen verursacht.

Die extrazelluläre Matrix (ECM) spielt beim Wachstum von Mammakarzinomen eine große Rolle. Im Normalgewebe stellt die ECM ein komplexes Netzwerk aus Glycoproteinen und Proteoglycanen dar (Noël & Foidart, 1998). Es bestimmt die Architektur von Geweben und beeinflusst viele biologische Aktivitäten. Dies geschieht durch die Modifikation der Organisation des Zytoskeletts und die Aktivierung von sekundären Botenstoffen und Proteinkinase-Signalwegen. Diese Informationen werden von den Zellen über spezielle Plasmamembranproteine, hauptsächlich Mitgliedern der Integrinfamilie, aufgenommen. Die Komponenten der ECM geben spezifische Signale, welche Proliferation, Differenzierung und biosynthetische Aktivitäten von Zellen direkt beeinflussen. Sie haben aber auch Einfluss auf die Migration und Morphologie der Zellen. Außerdem spielt die ECM eine essentielle Rolle beim Überleben von Zellen, denn der Verlust des Kontaktes mit der Matrix resultiert in Apoptose. Mammakarzinome sind oft durch Modifikationen in der ECM und in den zellulären Elementen des Stromas (Infiltration von Fibroblasten, endothelialen Zellen und inflammatorischen Zellen) charakterisiert. Stromazellen und ihre Produkte (Matrixkomponenten, Wachstumsfaktoren, Proteasen u. a.) beeinflussen den Phänotyp von Tumorzellen. Zum Beispiel bestehen über 70% der Stromazellen in dukalen Mammakarzinomen aus Myofibroblasten. Diese produzieren Enzyme wie die Urokinase, den Plasminogenaktivator und Stromelysin, die in der Proteolyse von Matrixkomponenten involviert sind. Die komplexen Kontakte des Tumors mit seiner Umgebung führen zu reziproken Einflüssen, die in Tumorförderung, Invasion und Metastasierung resultieren. Oft wird bei invasiven Mammakarzinomen eine exzessive Akkumulation von verschiedenen ECM-Komponenten wie Kollagen (Typ I, III, V), Fibronectin, Elastin und Proteoglykanen beobachtet. In infiltrierenden dukalen Karzinomen werden Trimere eines Typ I Kollagens (I-Trimer) und

EB-B+ Fibronectin exprimiert, welches sonst nur in nicht erwachsenem Brustgewebe gefunden wird. Weiterhin exprimieren Brusttumorzellen und Stromazellen die LamininB2-Kette, die in embryonalen Basalmembranen weit verbreitet ist.

1.3 Die Grundlagen der vorliegenden Arbeit

Es wurde ein durch das BMBF gefördertes Konsortium zur Analyse von Genen, deren Expression im Brust-, Ovarial- und Endometriumkarzinom deutlich von der Expression im entsprechenden Normalgewebe abweicht, gegründet. Die Firma metaGen (Berlin) hat einen neuen integrierten Ansatz entwickelt, um hunderte von Genen zu identifizieren, die in gynäkologischen Karzinomen differentiell exprimiert werden. Unter Verwendung entsprechender Software wurden vier Millionen ESTs und EST-Cluster, die in öffentlichen (dbEST, UniGene, TIGR) und kommerziellen (Incyte, LIFESEQ) Datenbanken verfügbar sind, sorgfältig *in silico* analysiert (Schmitt et al., 1999). Es wurden mehr als 600 Gene identifiziert, deren Expression im Brust-, Ovarial- und Endometriumkarzinom deutlich von der Expression im entsprechenden Normalgewebe abweicht. Ungefähr 50 % dieser Gene wurden bisher nicht beschrieben. Mit Hilfe der Technik des "*Radiation Hybrid Mapping*" wurde anschließend die chromosomale Lokalisation von mehr als 400 dieser Gene bestimmt. Weiterhin wurde eine Untergruppe von 195 Genen identifiziert, welche in chromosomalen Regionen liegen, die ein beträchtliches Maß an DNA-Verlusten und -Amplifikationen in gynäkologischen Karzinomen aufweisen. Zusätzlich wurden 40 Gene identifiziert, die in Form von Genclustern auftreten, aber in chromosomalen Regionen liegen, die bisher nicht mit der Entstehung gynäkologischer Karzinome in Zusammenhang gebracht wurden. Aus diesen 235 Genen wurden 50 Gene ausgewählt, die innerhalb des Projekts im Detail analysiert werden sollten. Durch bestehende Tumorbanken und die dazugehörige standardisierte klinische Dokumentation und histopathologische Klassifikation war es möglich, die *in silico* gefundenen Daten experimentell an einer großen Anzahl von Patientenproben zu validieren. Zur experimentellen Bestätigung der theoretisch ermittelten Expression der 50 identifizierten Kandidatengene sollten klassische Expressionsstudien durchgeführt werden. Zur detaillierten Analyse der 50 ausgewählten Kandidatengene gehörten die Identifizierung ihrer Exon-Intron-Strukturen, die Suche nach möglichen Spleißprodukten ihrer mRNA und die Identifizierung funktioneller Domänen in den Proteinen. Daran schlossen sich die Analyse von regionalem Verlust der Heterozygotität und von Hypermethylierungen bei potentiellen Tumorsuppressorgenen und der Nachweis von Mutationen in putativen Onkogenen an. Die Charakterisierung der genetischen Stoffwechselwege in gynäkologischen Tumoren und die

Durchführung von funktionellen Studien an ausgewählten Kandidatengenomen sollten die Analysen vervollständigen. Die Arbeiten wurden innerhalb des Konsortiums entsprechend der Qualifizierung der einzelnen Arbeitsgruppen aufgeteilt.

1.4 Zielstellung der Arbeit

Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung der Expression von 15 ausgewählten Tumorsuppressorgen und 5 potentiellen Onkogenen am Mammakarzinom. Dafür wurden 20 Patientenproben mit gut dokumentierten duktalem und lobulärem Mammakarzinom ausgewählt. Ziel des ersten Abschnitts der Arbeit war, die vorausgegangenen „*in silico*-Analysen“ experimentell zu bestätigen. Da die Auswahl von potentiellen Tumorgenen erstmalig auf diesem theoretischen Weg getroffen wurde, lag eine große Bedeutung in der Bestätigung der differentiellen Expression. Damit sollte bewiesen werden, dass eine theoretische Identifizierung neuer differentiell regulierter Gene eine methodisch valide Herangehensweise darstellt. Für die Expressionsanalysen wurden im Labor die Methoden der cDNA-Dot-Blot-Hybridisierung und Echtzeit-PCR etabliert, die es ermöglichten, die Translation der Kandidatengene parallel an einer großen Probenzahl zu untersuchen. Für einige besonders interessante Kandidatengene wurden außerdem RNA-RNA-*in situ*-Hybridisierungen und Immunhistochemie zur Expressionsanalyse verwendet.

Im weiteren Verlauf der Arbeit war es von Bedeutung, die Funktion der experimentell bestätigten regulierten Gene als mögliche Tumorsuppressorgene oder Onkogene zu untersuchen. Dafür wurde der gesamte offene Leserahmen dieser Gene in Expressionsvektoren kloniert und in Mammakarzinomzelllinien transfiziert. Analysiert wurden die Auswirkungen auf das klonale Wachstum, die Proliferationsgeschwindigkeit und die Invasivität der Mammakarzinomzelllinien. Zusätzlich zu den experimentellen Analysen wurden umfassende Datenbank- und Literaturrecherchen durchgeführt. Mit Hilfe der vorhandenen Daten sollte die Struktur der Gene, mRNAs und Proteine aufgeklärt werden. Außerdem war es möglich, Daten über die Regulation der Expression der Kandidatengene zu erhalten und bisher bekannte Verbindungen zu Tumoren zu identifizieren. Durch diese Untersuchungen konnten weitere Einblicke in die Funktionsweise und Expression dieser Gene beim Mammakarzinom gewonnen werden, um unter ihnen mögliche Kandidaten für neue Tumormarker oder Therapieansätze zu finden.

2 Methoden

2.1 Validierung der Expression potentieller Tumorsuppressor- und Onkogene

2.1.1 Amplifikation der cDNA-Klone

Für die Validierung der Expression potentieller Tumorsuppressor- und Onkogene wurden von der Firma Metagen 42 cDNA-Klone (bezogen vom IMAGE-Konsortium, Lennon et al., 1996) (siehe Tabelle 13 im Anhang), die für 20 Gene kodieren, zur Verfügung gestellt. Diese Plasmide dienten als Grundlage für alle anschließenden Analysen. Sie wurden für weitere Anwendungen durch Elektroporation in kompetente *E. coli* transformiert. Zur Elektroporation wurden 100 µl elektrokompente *E. coli* JM101 auf Eis aufgetaut und anschließend mit der Plasmid-DNA (100 ng) gemischt. Diese Probe wurde in einer Elektroporationsküvette (0,2 mm) eine Minute auf Eis inkubiert. Anschließend wurde die DNA durch einen Elektropuls (2,5 kV, 25 mF, 200 Ω) mit dem *Gene Pulser I* in die Bakterien übertragen. Danach wurden die Bakterien zur Regeneration der Zellwand und Expression des Selektionsmarkers (Ampicillinresistenzgen) in 900 µl SOC-Medium eine Stunde bei 37 °C schüttelnd inkubiert. Nach dem Ausstreichen von 50 µl des Transformationsansatzes auf LB-Agarplatten mit 100 µg/ml Ampicillin (Plattenkultur) und Inkubation der Platten üN bei 37 °C wurden für jeden cDNA-Klon eine der ausgewachsenen Kolonien in 5 ml LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin (Flüssigkultur) überführt und wiederum üN bei 37 °C schüttelnd inkubiert.

Für die folgenden Experimente wurde Plasmid-DNA mit großer Reinheit und in hoher Konzentration benötigt. Um dies zu erreichen, wurden aus 4 ml Flüssigkultur Minipräparationen von Plasmid-DNA mit Hilfe des QIAprep Spin Miniprep Kits nach Herstellerprotokoll durchgeführt. Das Prinzip des Kits beruht auf einer modifizierten alkalischen Lyse der Bakterien nach Birnboim und Doly, 1979. Die DNA-Konzentration der Minipräparationen wurde spektrophotometrisch bestimmt. Nach Messung der optischen Dichte der Probe bei 260 nm kann die Konzentration mittels folgender Formel berechnet werden:

$$c \text{ [}\mu\text{g/}\mu\text{l]} = \frac{V_f \times OD_{260} \times F}{1000}$$

V_f - Verdünnungsfaktor
 F - Konzentration an Nukleinsäuren, bei welcher $OD_{260}=1$
 für DNA-Doppelstrang: $F = 50 \mu\text{g/ml}$
 für DNA-Einzelstrang: $F = 33 \mu\text{g/ml}$
 für RNA: $F = 40 \mu\text{g/ml}$

Außerdem wurde zusätzlich die optische Dichte der Lösung bei 280 nm bestimmt, um Aufschluss über die Reinheit der extrahierten Nukleinsäure zu erhalten. Dazu bildet man das Verhältnis $OD_{260}:OD_{280}$, welches im günstigsten Fall 2:1 betragen sollte. Die Ausbeute der Minipräparationen, ausgehend von 4 ml Bakterienkultur, betrug etwa 25 – 30 µg. Die extrahierte Plasmid-DNA wurde bei -20 °C gelagert. Von allen Klonen wurden zur Konservierung Glycerinkulturen angefertigt. Dazu wurden 500 µl der Übernachtskultur mit

500 µl 50%igem Glycerin gemischt, 30 min auf Eis inkubiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend bei -80 °C gelagert.

2.1.2 Klonierung von Haushaltsgenen

Um die Expression der untersuchten Gene in den verschiedenen Geweben vergleichen zu können, müssen sie an mehreren so genannten Haushaltsgenen normalisiert werden. Kloniert wurden dafür Fragmente von β -Aktin, β -Katenin, β -2-Mikroglobulin, basic protein, GAPDH, HPRT, Keratin 8, ribosomales Protein S9 und Tubulin in den Vektor pCRII TOPO.

Mittels RT-PCR wurden die entsprechenden Fragmente an RNA aus Gewebeschnitten amplifiziert. Die reverse Transkription von mRNA wurde mit der *SUPERSCRIPT II RNase H⁻ Reverse Transcriptase* unter Verwendung des CDS-Primers nach Herstellerprotokoll durchgeführt. Anschließend folgte eine PCR mit den entsprechenden Primern für die acht Haushaltsgene (siehe Tabelle 15 im Anhang).

pro PCR-Ansatz:		
PCR-H ₂ O		26,25 µl
2 mM je dNTP		5,00 µl
10 x PCR-Puffer		5,00 µl
25 mM MgCl ₂		5,00 µl
99,9 % DMSO		2,50 µl
5 U/µl AmpliTaq		0,25 µl
10 pmol/µl Vorwärtsprimer		2,00 µl
10 pmol/µl Rückwärtsprimer		2,00 µl
~10 ng/µl cDNA		2,00 µl
gesamt		50,00 µl
PCR-Programm:		
Denaturierung	T = 94 °C	1 min
40 Zyklen		
Denaturierung	T = 94 °C	15 s
Annealing	T = T _m Primer - 5°C	30 s
Elongation	T = 72 °C	1 min 30 s
Elongation	T = 72 °C	8 min 30 s

Die Reaktionsansätze wurden im 1%igen Agarosegel aufgetrennt und die entsprechenden Banden anschließend unter langwelligem UV-Licht (366 nm) mit einem Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten. Die Extraktion der DNA aus dem Gelstück erfolgte mit dem QIAquick Gel Extraction Kit nach den Angaben des Herstellers.

Die Konzentration der extrahierten DNA wurde im 1%igen Agarosegel anhand des Markers λ /Hind III abgeschätzt. Die Klonierung von ca. 200 ng DNA in den Vektor pCRII TOPO erfolgte mit dem „TOPO TA Cloning Kit“ nach Herstellerprotokoll. Es wurden von jeweils fünf Kolonien Minipräparationen der Plasmid-DNA angefertigt. Dabei wurde die Methode der alkalischen Lyse von Bakterien nach Birnboim und Doly, 1979 verwendet. Zur Mini-präparation von Plasmid-DNA wurden 2 ml der Flüssigkultur zentrifugiert, in 100 µl Lösung I resuspendiert und 10 min bei RT inkubiert. Nach Zugabe von 200 µl Lösung II wurde die Probe vorsichtig gemischt und 10 min im Eisbad inkubiert. Anschließend wurden 150 µl Lösung III zugegeben, gemischt und 5 min im Eisbad inkubiert. Ausgefallene Proteine und

genomische DNA wurden durch 20minütige Zentrifugation bei 10600 x g abgetrennt. Der plasmidhaltige Überstand wurde mit 2 Volumen eiskaltem 96%igen Ethanol versetzt und die DNA 10 min bei -20°C gefällt. Eine Zentrifugation von 20 min, 10600 x g bei 4°C bewirkte die Pelletierung der Plasmid-DNA. Das Pellet wurde mit 200 μl 70%igem Ethanol gewaschen und 5 min bei 10600 x g zentrifugiert, der Überstand wurde verworfen und das Pellet leicht getrocknet. Anschließend erfolgte die Aufnahme in 50 μl TE-Puffer mit 0,5 μl *RNaseA* (10 mg/ml) und 5minütige Inkubation bei RT zum Abbau der ebenfalls pelletierten RNA. Die restliche Flüssigkultur wurde bis zur Konservierung bei 4°C gelagert.

Die extrahierten Plasmid-DNAs wurden durch Restriktionsspaltung mit dem Enzym *EcoR* I auf Fragmente in richtiger Größe überprüft. Die angesetzte Restriktion wurde 2 Stunden bei der vom Hersteller empfohlenen Temperatur (37°C) inkubiert. Anschließend wurde durch Auftrennen der Reaktionsprodukte (gesamter Restriktionsansatz + 4 μl 6 x DNA-Ladepuffer) die Größe der linearisierten Plasmide im 1%igen Agarosegel mit 1 x TBE als Laufpuffer überprüft. Ethidiumbromid wurde dem Gel in einer Konzentration von 1 $\mu\text{g/ml}$ zugegeben. Als Längenmarker diente die 1 kb Leiter von GIBCO BRL.

Restriktionsansatz:	
Plasmid-DNA	1,00 μl
10x <i>EcoR</i> I-Puffer	2,00 μl
<i>EcoR</i> I	0,50 μl
10 x BSA	2,00 μl
<u>A. bidest</u>	<u>14,30 μl</u>
gesamt	20,00 μl

Ausgewählte Klone wurden zur Bestätigung sequenziert und als Glycerinkulturen konserviert.

2.1.3 cDNA-Dot-Blot

Mittels der Methode des cDNA-Dot-Blot sollte die Expression von 15 potentiellen Tumorsuppressorgen und 5 putativen Onkogenen aufgeklärt werden. Untersucht wurde die Genexpression an 21 duktales invasiven Karzinomen der Mamma und 4 Normalgeweben der Mamma (Tumordaten siehe Tab. 19 und 20 im Anhang). Es wurde die Methode eines reversen Northern-Blots verwendet, da von den Biopsien nur geringe Mengen an RNA zur Verfügung standen und die Zahl der zu untersuchenden cDNA-Klone hoch war. Es wurden jeweils 100 ng eines genspezifischen PCR-Produkts auf eine positiv geladene Nylonmembran aufgebracht und mit revers transkribierter und radioaktiv markierter RNA hybridisiert. Abhängig von der für das jeweilige Gen, vorhandenen Menge an mRNA fiel die Intensität des Hybridisierungssignals aus. Dieses sollte bei Tumorsuppressorgen im Tumor niedriger sein als im Normalgewebe und bei Onkogenen höher. Die Intensität der Hybridisierungssignale wurde zur Auswertung herangezogen.

2.1.3.1 PCR an den cDNA-Klonen und Haushaltsgenen

Für die cDNA-Dot-Blots wurden PCR-Produkte verwendet, da durch eine ähnliche Größe ähnliche Molekülzahlen gewährleistet und ein Hintergrund durch Verunreinigungen mit Fremd-DNA bei der Hybridisierung ausgeschlossen werden kann. Die Wahl der optimalen

PCR-Primer erfolgte mit dem Programm HUSAR anhand der cDNA-Klone. Sie sollten möglichst im 3'-Bereich der kodierenden Sequenzen der Gene liegen, zwischen 150 und 250 bp groß sein, eine ähnliche Schmelztemperatur haben und sie sollten zwischen 19 und 21 bp lang sein. Alle Angaben zu Primern und den PCR-Produkten sind in Tabelle 14 des Anhangs aufgelistet. Die Sequenzen der PCR-Produkte wurden mit dem Programm BLAST auf mögliche unspezifische Bindungen an Gene ähnlicher Sequenz und auf Kreuzreaktionen untereinander überprüft.

Für jedes Primerpaar wurden die optimalen PCR-Bedingungen ermittelt. Für die Herstellung aller cDNA-Dot-Blots wurden ungefähr 3 µg jedes PCR-Produktes benötigt. Die PCR wurde in mehreren Parallelansätzen mit einem Probenvolumen von 50 µl durchgeführt. Jedes PCR-Produkt wurde nach der Amplifikation elektrophoretisch kontrolliert.

pro PCR-Ansatz:		
PCR-H ₂ O		26,25 µl
2mM je dNTP		5,00 µl
10x PCR-Puffer		5,00 µl
25 mM MgCl ₂		5,00 µl
99,9 % DMSO		2,50 µl
5 U/µl <i>AmpliTaq</i>		0,25 µl
10 pmol/µl Vorwärtsprimer		2,00 µl
10 pmol/µl Rückwärtsprimer		2,00 µl
100 pg/µl Plasmid – DNA		2,00 µl
gesamt		50,00 µl
PCR-Programm:		
Denaturierung	T = 94 °C	1 min
40 Zyklen		
Denaturierung	T = 94 °C	15 s
Annealing	T = T _m Primer - 5°C	30 s
Elongation	T = 72 °C	1 min 30 s
Elongation	T = 72 °C	8 min 30 s

2.1.3.2 **Aufreinigung der PCR-Produkte**

Die anschließende Aufreinigung spezifischer PCR-Produkte erfolgte nach Herstellerangaben mit dem „*High Pure PCR Product Purification Kit*“. Anschließend wurde die DNA-Konzentration am Spektrophotometer bestimmt und mit 1 x TE-Puffer auf 10 ng/µl eingestellt. Jedes PCR-Produkt wurde nach der Aufreinigung und Konzentrationsbestimmung nochmals elektrophoretisch kontrolliert.

2.1.3.3 **Bindung der PCR-Produkte an Membranen**

Die aufgereinigten PCR-Produkte wurden kovalent an positiv geladene Nylonmembranen gebunden. Die Blots wurden im 96-Loch-Format angefertigt, und um eine bessere Auswertung zu gewährleisten, wurden alle Proben und die Haushaltsgene doppelt aufgetragen. Für jedes Loch wurden 10 µl (entspricht 100 ng) des entsprechenden PCR-Produktes mit dem gleichen Volumen 0,8 N Natronlauge gemischt und 15 min bei RT denaturiert. Die Proben wurden bei 25 mBar Unterdruck langsam durch eine mit 2 x 200 µl

A. bidest. gewaschene Nylonmembran gesaugt. Nach dem Probenauftrag wurde die Membran mit 2 x 200 µl 0,4 N Natronlauge gespült. Dann wurde die Membran getrocknet und anschließend 5 min in 2 x SSC gespült. Nach dem Trocknen wurden die aufgetragenen PCR-Produkte durch Bestrahlen mit ultraviolettem Licht bei 125 mJ kovalent an die Membran gebunden.

2.1.3.4 Isolierung von geringen Mengen RNA aus Gewebeschnitten

Für die RNA-Extraktion wurden 20 Gewebeschnitte á 10 µm angefertigt und in ein 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Zwei weitere Schnitte (vor und nach den Schnitten für die RNA-Extraktion) mit einer Stärke von 5 µm wurden zur histologischen Kontrolle einer HE-Färbung unterzogen. Zu den Gefrierschnitten wurden 250 µg Glycogen und 1 ml TRIZOL-Reagenz gegeben (Bracete, A.M. et al. 1999). Die Probe wurde homogenisiert und 5 min bei RT inkubiert, dann wurden 200 µl Chloroform zugegeben und nach 3 x 20 s verwirbeln wurde 2 bis 4 min bei RT inkubiert. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation von 15 min bei 4 °C und 15300 x g. Die RNA in der oberen wässrigen Phase wurde in ein frisches *RNase*-freies 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Dann erfolgte die Zugabe von 500 µl Isopropanol. Dieser Ansatz wurde 5 min bei RT inkubiert. Nach der anschließenden Zentrifugation von 10 min bei 4 °C und 15300 x g lag die RNA pelletiert vor. Das Pellet wurde durch Zugabe von 1 ml 75%igem Ethanol und 5minütige Zentrifugation bei 5000 x g und 4 °C gewaschen. Das RNA-Pellet wurde getrocknet und in 50 µl nukleasefreiem Wasser durch 10minütige Inkubation bei 65 °C gelöst. Die Aufbewahrung der gelösten RNA erfolgte bei -80 °C.

2.1.3.5 Konzentrationsbestimmung von RNA aus Gewebeschnitten

Für RNA aus Gewebeschnitten erfolgte die Konzentrationsbestimmung aufgrund der erwarteten geringen Konzentration und des niedrigen Probenvolumens nicht spektrophotometrisch, sondern wurde im Agarosegel abgeschätzt. Hierzu wurden 2 µl der RNA-Probe elektrophoretisch aufgetrennt. Als Marker für die Konzentrationsbestimmung wurde 1 µg RNA-Leiter benutzt. Nach der Elektrophorese konnte durch einen Vergleich der Signalintensität der Probe mit der RNA-Leiter die ungefähre Konzentration der Probe bestimmt werden. Zur Kontrolle der Güte wurde die Intensität der 18S und 28S rRNA-Banden herangezogen.

2.1.3.6 DNase-Behandlung von RNA

Um bei folgenden Experimenten eine Bindung von Primern oder Sonden an eventuell vorhandene genomische DNA zu verhindern, wurde diese enzymatisch degradiert. Zu der gesamten RNA-Probe (50 µl) wurden 20 µl 10 x *RQ1 DNase*-Reaktionspuffer, 2 µl *RQ1 DNase* (1 U/µl) und 0,5 µl *RNasin* Ribonuklease Inhibitor (10 U/µl) gegeben, das Probenvolumen wurde mit nukleasefreiem Wasser auf 200 µl aufgefüllt. Die DNA-Degradation wurde 1 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden Proteine und die fragmentierte DNA durch eine Phenol-Chloroform-Extraktion entfernt und die RNA gefällt.

Zu der zu reinigenden Probe wurden 20 µg Glycogen und 1 Volumen Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) gegeben und die Probe 3 x 5 s verwirbelt. Nach einer 5minütigen Zentrifugation bei 20800 x g wurde die obere wässrige Phase in ein frisches nukleasefreies 1,5 ml Reaktionsgefäß pipettiert und 1 Volumen Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) zugegeben. Die Probe wurde wieder 3 x 5 s verwirbelt und 5 min bei 20800 x g zentrifugiert. Dann wurde wieder die obere wässrige Phase in ein frisches nukleasefreies 1,5 ml Reaktionsgefäß pipettiert und zur Fällung der RNA 1/5 Volumen 7,5 M Ammoniumacetat, 20 µg Glycogen und 2 Volumen 96%iger Ethanol zugegeben. Nach kurzem Verwirbeln wurde die zu fällende RNA 20 min bei -20 °C eingefroren und anschließend 30 min bei 4 °C und 20800 x g zentrifugiert. Mit 1 ml 70%igem Ethanol und anschließender Zentrifugation (10 min bei 4 °C und 20800 x g) wurde die RNA gewaschen, dann leicht getrocknet und anschließend in 20 µl nukleasefreiem Wasser gelöst und 10 min bei 65 °C inkubiert.

2.1.3.7 Sondenmarkierung

Das Protokoll zur radioaktiven Markierung revers transkribierter RNA und zur Hybridisierung der cDNA-Dot-Blots wurde aus dem „Atlas™ cDNA Expression Arrays User Manual“ übernommen. Die RNA und der CDS-Primer wurden in einem Volumen von 12 µl 10 min bei 70 °C denaturiert und anschließend auf Eis abgekühlt. Zu dieser Probe wurden 8 µl Reaktionsmix gegeben. Die Markierung erfolgte anschließend für 30 min bei 48 °C.

Reaktionsansatz:

1µg DNase-behandelte RNA	11,00 µl
10 pmol/µl CDS-Primer	1,00 µl
5x Erststrangpuffer	2,00 µl
0,1 M DTT	0,50 µl
5 mM dNTP (ohne ATP)	1,00 µl
α - ³² PdATP	3,50 µl
<u>1,5 U/µl Superscript II</u>	<u>1,00 µl</u>
gesamt	20,00 µl

Die Probe wurde nach Herstellerprotokoll mit einer Sephadex G50-Säule aufgereinigt. Anschließend wurde die Einbaurate an α -³²PdATP in die cDNA-Probe im Coulter Counter vermessen. Dann wurde die Probe mit A. bidest. auf 200 µl aufgefüllt, 20 µl 10 x Denaturierungslösung zugegeben und 20 min bei 68 °C inkubiert. Zur denaturierten Probe wurden 5 µl C₀t1-DNA und 225 µl 2 x Neutralisierungslösung gegeben und nochmals 10 min bei 68 °C inkubiert.

2.1.3.8 Hybridisierung der cDNA-Dot-Blots mit radioaktiv markierter cDNA

Zur Rehydrierung wurde der cDNA-Dot-Blot 10 min bei 80 °C in 0,5 % SDS schwenkend inkubiert. Für die Vorhybridisierungslösung wurden 500 µg denaturierte Lachs-Sperma-DNA zu 5 ml auf 68 °C vorgewärmte Expresshyb gegeben (Endkonzentration 100 µg/ml). Anschließend wurde der cDNA-Dot-Blot mit der Vorhybridisierungslösung in einer Hybridisierungsröhre für 6 h bei 68 °C im Hybridisierungssofen, rotierend bei 6 U/min, inkubiert. Die anschließende Hybridisierung erfolgte nach Zugabe der markierten Sonde für 24 h bei 68 °C. Gewaschen wurde 4 x für 30 min bei 68 °C mit 2 x SSC/0,1 % SDS in der

Hybridisierungsröhre mit einer Rotationsgeschwindigkeit von 13 U/min. Anschließend wurde zum Herabsetzen der Salzkonzentration 5 min bei RT mit 2 x SSC gewaschen. Die hybridisierten cDNA-Dot-Blots wurden zur Auswertung am Phosphorimager mit den entsprechenden BioImager-Platten 6 Stunden exponiert, anschließend erfolgte eine Exposition mit Röntgenfilm über Nacht. Die Langzeitexposition wurde mit den BioImager-Platten über Nacht durchgeführt und mit Röntgenfilm über 3 Tage. Die BioImager-Platten wurden nach der Exposition am Phosphorimager eingelesen und die Röntgenfilme nach Vorschrift entwickelt. Für die Berechnung der Expressionsunterschiede wurde der Grad der Schwärzung (PSL) herangezogen. Die Auswertung erfolgte mittels des Programms AIDA Ver 3.00. Zur Normalisierung der Daten wurde mit dem Programm geNORM V3.3 der Normalisierungsfaktor berechnet (Vandesompele et al., 2002). Alle weiteren Auswertungen wurden in Microsoft® Excel 2002 durchgeführt.

2.1.4 Echtzeit-PCR

Um die Daten der cDNA-Dot-Blots zu verifizieren, wurde zusätzlich eine Echtzeit-PCR durchgeführt. Für diese Methode wurde das PCR-Gerät Rotor-Gene 2000 verwendet. Die Reaktionsbedingungen wurden von der PCR für die cDNA-Dot-Blots übernommen und mit *SYBR Green I* für jedes Primerpaar nochmals getestet. Die PCR wurde mit einem Probenvolumen von 25 µl pro Reaktionsgefäß durchgeführt. Für die reverse Transkription wurden die bereits für die cDNA-Dot-Blots verwendeten RNAs benutzt. Zur Berechnung der Konzentration der eingesetzten cDNA wurde eine Standardreihe mit Konzentrationen von 4 pg bis 0,78 ag (halbierend) aus der Plasmid-DNA des jeweiligen untersuchten cDNA-Klons angefertigt. Die Fluoreszenzmessung während der Echtzeit-PCR erfolgte jeweils nach der Elongation im Messkanal 1 mit einer Anregung von 494 nm und einer Ausstrahlung von 510 nm.

PCR-Ansatz:		
PCR-H ₂ O		9,38 µl
10x SYBR Green I		0,62 µl
10x PCR-Puffer		2,50 µl
25 mM MgCl ₂		3,50 µl
10mM dNTP		2,50 µl
10 pmol/µl Vorwärtsprimer		2,00 µl
10 pmol/µl Rückwärtsprimer		2,00 µl
99,9 % DMSO		1,25 µl
5 U/µl AmpliTaqGold		0,25 µl
<u>~10 ng/µl cDNA-Template</u>		<u>1,00 µl</u>
gesamt		25,00 µl
PCR-Programm		
Denaturierung	T = 96 °C	5 min
40 Zyklen		
Denaturierung	T = 94 °C	15 s
Annealing	T = T _m Primer - 5°C	30 s
Elongation	T = 72 °C	1 min
Messung der Fluoreszenz		
Temperatur halten	T = 60 °C	5 min
Schmelzkurve	T = 60 °C → 99 °C	1 °C/5 s

Die resultierenden PCR-Produkte wurden elektrophoretisch kontrolliert. Die Konzentration der zu untersuchenden Proben wurde mit dem Programm Rotor-Gene Version 5.0.47 ermittelt. Der Normalisierungsfaktor wurde mit dem Programm geNORM V3.3 berechnet. Alle weiteren Auswertungen wurden in Microsoft® Excel 2002 durchgeführt.

2.2 Klonierung ausgewählter Kandidatengene

Von sechs ausgewählten Kandidatengenen wurde der komplette offene Leserahmen in verschiedene Expressionsvektoren kloniert. Diese Plasmide wurden in weiteren Experimenten für die Proteinexpression und für funktionelle Untersuchungen verwendet.

2.2.1 Datenbankrecherchen

Mit Hilfe der vorhandenen cDNA-Klone und dem Programm BLAST wurden die mRNA-Sequenzen für die entsprechenden Gene ermittelt. Anhand dieser Sequenzen wurden, ausgehend von den angegebenen Start- und Stopcodons, Primer für die Klonierung der offenen Leserahmen ausgewählt. Diese Primer enthielten eine Restriktionsstelle, das Start- bzw. Stopcodon und die folgenden 17 Nukleotide der entsprechenden Sequenz. Durch Anfügen zwei verschiedener Restriktionsschnittstellen an die Primer für das 5'- bzw. 3'-Ende der DNA konnte eine gerichtete Klonierung gewährleistet werden.

2.2.2 PCR

Um eine fehlerfreie Amplifikation der offenen Leserahmen zu gewährleisten, wurde für die PCR eine DNA-Polymerase mit hoher 3'-5' Exonuklease-Aktivität ausgewählt. Es wurde die Platinum® *Pfx* DNA Polymerase mit einer Fehlerrate von $4,9 \times 10^{-7}$ verwendet. Als Ausgangsmaterial für die Klonierungen diente RNA isoliert aus Plazenta. Die entsprechenden Fragmente wurden mittels RT-PCR amplifiziert. Die reverse Transkription von mRNA wurde mit der *SUPERSCRIPT II RNase H⁻ Reverse Transcriptase* unter Verwendung des CDS-Primers nach Herstellerprotokoll durchgeführt. Anschließend folgte eine PCR mit den entsprechenden Primern (Tabellen 16 und 17) für die sechs Kandidatengene.

PCR-Ansatz:		
PCR-H ₂ O		30,50 µl
10x <i>Pfx</i> -Amplifikations Puffer		5,00 µl
50 mM MgSO ₄		1,00 µl
10mM dNTP-Mix		1,50 µl
10 pmol/µl Vorwärtsprimer		0,75 µl
10 pmol/µl Rückwärtsprimer		0,75 µl
10x <i>Enhancer</i> Lösung		5,00 µl
2,5 U/µl Platinum® <i>Pfx</i> DNA Polymerase		0,50 µl
~10 ng/µl cDNA		5,00 µl
gesamt		50,00 µl

PCR-Programm		
Denaturierung	T = 94 °C	2 min
30 Zyklen		
Denaturierung	T = 94 °C	15 s
Annealing	T = 55 °C	30 s
Elongation	T = 68 °C	1 min

Die PCR-Reaktion wurde mit dem „*High Pure PCR Product Purification Kit*“ aufgereinigt, um für den folgenden Restriktionsverdau die Salzkonzentration zu verringern und die DNA-Polymerase sowie die Primer zu entfernen. Die Reaktionsansätze wurden dann üN bei 37 °C einem Restriktionsverdau unterzogen.

Restriktionsansatz:	
PCR-Reaktion	50,00 µl
10x <i>EcoR</i> I-Puffer/ <i>BamH</i> I-Puffer/Puffer 3	20,00 µl
<i>EcoR</i> I/ <i>BamH</i> I/ <i>Not</i> I	5,00 µl
100x BSA	2,00 µl
PCR-H ₂ O	133,00 µl
gesamt	200,00 µl

Anschließend erfolgte eine elektrophoretische Auftrennung des Restriktionsansatzes. Die Banden wurden aus dem Gel ausgeschnitten und die DNA aus dem Gelstück mit dem *QIAquick Gel Extraction Kit* nach den Angaben des Herstellers extrahiert.

2.2.3 Klonierung

Die Konzentration der extrahierten DNA wurde im 1%igen Agarosegel anhand des Markers λ /*Hind* III abgeschätzt. Die Klonierung der PCR-Produkte in die Vektoren erfolgte mittels der T4 DNA-Ligase im molaren Verhältnis von 3:1 mit einer DNA-Endkonzentration von 100 ng. Durchgeführt wurde die Ligation in einem Volumen von 10 µl unter Zugabe von 2 µl 5 x Ligasepuffer und 1 µl T4 DNA-Ligase (1 U/µl). Der gesamte Ligationsansatz wurde in chemisch kompetente *E. coli* JM 109 transformiert. Dazu wurden 200 µl Aliquots der Bakterien langsam auf Eis aufgetaut. Anschließend wurde der Ligationsansatz (10 µl) zugegeben, kurz vermischt und 30 min auf Eis inkubiert. Nach einem Temperaturschock (90 s bei 42 °C) wurden 800 µl SOC-Medium zugegeben und anschließend eine Stunde bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. Von dieser Kultur wurden dann 200 µl auf Agarplatten mit 30 µg/ml Kanamycin ausplattiert und üN bei 37 °C inkubiert. Es wurden von jeweils 5 Kolonien Minipräparationen mit der Methode der alkalischen Lyse der Bakterien nach Birnboim und Doly, 1979 angefertigt. Die isolierte Plasmid-DNA wurde durch Restriktion mit den Enzymen *EcoR* I/*Not* I bzw. *BamH* I/*Not* I und Auftrennen der Reaktionsprodukte im Agarosegel auf Fragmente in richtiger Größe überprüft. Als Längenmarker diente die 1 kb Leiter. Die restliche Kultur wurde bis zur Konservierung bei 4 °C gelagert.

Restriktionsansatz:	
Plasmid-DNA	3,00 µl
10x <i>EcoR</i> I-Puffer bzw. <i>BamH</i> I-Puffer	2,00 µl
<i>EcoR</i> I bzw. <i>BamH</i> I	0,50 µl
<i>Not</i> I	0,50 µl
100 x BSA	0,20 µl
<u>A. bidest</u>	<u>13,80 µl</u>
gesamt	20,00 µl

2.2.4 Sequenzierung

Klone mit einem Fragment in richtiger Größe wurden zur Sequenzanalyse nach dem Prinzip des Cycle Sequencing mit dem LICOR 4000 analysiert. Dazu wurden von diesen Proben Minipräparationen von Plasmid-DNA mit Hilfe des „*QIAprep Spin Miniprep Kits*“ nach Herstellerprotokoll angefertigt. Zur Sequenzierung wurde der „*SequiTherm EXCEL™ II DNA Sequencing Kit-LC*“ verwendet. In einem Eppendorfgefäß wurden 0,5 µg DNA der zu sequenzierenden Probe, 7,2 µl des 3,5 x SequiTherm EXCEL II Sequenzierpuffers, 2 µl fluoreszenzmarkierter Primer (1 pmol/µl) (siehe Tab. 18 im Anhang) und 1 µl SequiTherm EXCEL II DNA Polymerase (5 U/µl) gemischt und mit Wasser auf ein Gesamtvolumen von 17 µl aufgefüllt. In einer Mikrotiterplatte wurden jeweils 1,5 µl der Nukleotid-Reagenzien in benachbarte Löcher pipettiert. Dazu wurden 4 µl des DNA-Primer-Gemisches gegeben. Die Reaktion wurde mit einem PCR-Wachs überschichtet. Die Sequenzierungsreaktion erfolgte nach folgendem PCR-Programm:

Denaturierung	T = 95°C	5 min
30 Zyklen		
Denaturierung	T = 95°	30 sec
Annealing	T = 50°C	15 sec
Elongation	T = 70°C	1 min

Zum Abstoppen der Reaktion wurden 3 µl Gelladepuffer zugegeben. Dann wurden die Proben auf das Sequenziergel aufgetragen. Für die Sequenzierung wurde ein denaturierendes 41 cm langes und 0,25 mm dickes 6%iges Polyacrylamidgel hergestellt. Zur Einstellung einer gleichmäßigen Temperatur des Gels, dem Aufbau eines einheitlichen elektrischen Feldes sowie der Fokussierung des Lasers erfolgte ein mindestens 30minütiger Vorlauf des Gels unter folgenden Bedingungen:

Spannung	1500 V
Stromstärke	35 mA
Leistung	40 W
Temperatur	45 °C

Nach Erreichen der Betriebsspannung und –temperatur wurden die Proben aufgetragen. Die Elektrophorese der Sequenzierreaktion fand unter den oben genannten Parametern statt. Die Auswertung der Sequenzen erfolgte unter Nutzung des Programms BaseImageIR V2.2. Der Abgleich gegen die Datenbankeinträge der entsprechenden Gene wurde mit dem Programm BLAST durchgeführt.

2.2.5 Midipräparation

Von den in ihrer Sequenz bestätigten Klonen wurden zur Konservierung Glycerinkulturen angefertigt. Außerdem wurde für weitere Experimente eine große Menge an hochreiner Plasmid-DNA benötigt. Zur Isolierung der Plasmid-DNA aus Bakterien wurde der *Invisorb Plasmid-Midiprep Kit* eingesetzt. Die Plasmid-Extraktion aus 200 ml Bakterienkultur erfolgte nach Herstellerprotokoll. Das Prinzip des Kits beruht auf einer modifizierten alkalischen Lyse der Bakterien nach Birnboim und Doly, 1979. Anschließend wurden die extrahierten Plasmid-

DNAs spektrophotometrisch vermessen und nach Restriktionsverdau im Agarosegel überprüft. Die Plasmid-DNA wurde in einer Konzentration von 1 µg/µl bei -20 °C aufbewahrt.

2.3 Expression und Aufreinigung von rekombinanten Proteinen

2.3.1 Das Expressionssystem pET

Das verwendete pET Expressionssystem (Abb. 25, Expressionsvektor pET29a) von Novagen erlaubt eine kontrollier- und induzierbare Proteinexpression mit gleichzeitig sehr geringer Basalexpression des rekombinanten Proteins. Der zu exprimierende offene Leserahmen des rekombinanten Proteins und das Gen für die T7 RNA-Polymerase stehen unter Kontrolle des *lac*-Operators. An diesen kann der im bakteriellen Chromosom, sowie im Expressionsplasmid kodierte *lac*-Repressor (*lacI*) binden. Im nicht induzierten Zustand bindet *lacI* an die Operatorsequenzen und verhindert eine Expression der T7 RNA-Polymerase und damit des rekombinanten Proteins. Im Falle der Induktion der Proteinexpression mit IPTG löst sich *lacI* vom *lac*-Operator, die T7 RNA-Polymerase wird exprimiert und bindet nun ihrerseits an den T7 Promotor des Expressionsplasmids mit der Konsequenz, dass die Transkription des klonierten offenen Leserahmens beginnt.

An die rekombinanten Proteine wurde am carboxyterminalen Ende ein *His-Tag* angehängt, über welchen das rekombinante Protein selektiv an eine Nickel-NTA-Matrix binden kann. Diese Wechselwirkung wird zur affinitätschromatographischen Aufreinigung von Proteinen genutzt, da Nickel-NTA-Agarose eine hohe Affinität zu Proteinen und Peptiden hat, die über mehrere konsekutive Histidinreste (*His-Tag*) verfügen (Hochuli, 1990; Hochuli et al., 1987).

2.3.2 Proteinexpression im analytischen Maßstab

Die Proteinexpression im analytischen Maßstab soll zeigen, ob die mit dem Expressionsplasmid transformierten Bakterien unter den gewählten Bedingungen das gewünschte Protein exprimieren.

Zur Proteinexpression wurden die in pET29a klonierten offenen Leserahmen (siehe Tab. 17 im Anhang) in einen bakteriellen Expressionsstamm transformiert, welcher für das Gen der T7 RNA-Polymerase kodiert. Dazu wurden 100 ng Plasmid-DNA in chemisch kompetente *E. coli* BL21(DE3) transformiert. Von diesem Transformationsansatz wurden dann 200 µl auf Agarplatten mit 30 µg/ml Kanamycin plattiert und üN bei 37 °C inkubiert. Von 5 der ausgewachsenen Kolonien wurden 5 ml Flüssigkultur angeimpft. Die Bakterien wurden nun üN bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. Am nächsten Tag wurden 10 ml LB-Medium (mit Kanamycin 100 µg/ml) mit 500 µl der Übernachtskultur angeimpft und weiter bei 37 °C schüttelnd inkubiert. Als die optische Dichte der Expressionskulturen OD₅₉₅ = 0,5 - 0,7 betrug, wurde die Proteinexpression durch Zugabe von IPTG (Endkonzentration 1 mM) induziert. Vor der Induktion wurde der Kultur 1 ml Probe als Kontrolle entnommen. Die Expressionskultur wurde weitere 5 h bei 37 °C geschüttelt und stündlich jeweils 1 ml Probe

zur Expressionsanalyse und parallel dazu 500 µl Probe zur Bestimmung der optischen Dichte entnommen. Die von den Expressionskulturen entnommenen Proben wurden durch Zentrifugieren (2 min, 6600 x g, bei RT) pelletiert und der Überstand entfernt. Die bakteriellen Pellets wurden in 500 µl A. bidest. (OD_{595} der Expressionskultur < 1) oder in 1 ml A. bidest. (OD_{595} der Expressionskultur > 1) resuspendiert, verwirbelt und für 10 min bei 95 °C inkubiert. Nach Zugabe von 4 µl 6 x SDS-Gelladepuffer zu 20 µl jeder Probe und nochmaligem 5minütigem Erhitzen bei 95 °C wurden die Proben zum Vergleich des Gesamt-Proteingehalts der Bakterien vor und nach Induktion im SDS-Polyacrylamidgel analysiert. Alle Parameter der Proteinexpression wie Induktionszeitpunkt, IPTG-Endkonzentration, Induktionszeit und -temperatur wurden zur Optimierung der Proteinexpression variiert. Von den auf Proteinexpression untersuchten Klonen wurde eine Glycerinkultur angefertigt.

Durch die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) wurden die zu analysierenden Proteine unter denaturierenden Bedingungen nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Eingesetzt wurde ein diskontinuierliches Verfahren nach Laemmli (Laemmli, 1970). Das Gel setzt sich aus einem Sammelgel geringerer Acrylamidkonzentration und einem Trenngel zusammen. Im Sammelgel wurde die Probe zu einer schmalen Startbande konzentriert, wodurch eine höhere Trennschärfe während der Auftrennung im Trenngel erreicht wurde. Die Konzentration von Acrylamid im Trenngel richtete sich nach der Größe der zu trennenden Proteine (15%: 10-50kDa, 10%: 30-100kDa, 5%: 80-200kDa). Die Elektrophorese erfolgte bei 25 bis 35 mA. Die in SDS-Polyacrylamidgelen aufgetrennten Proteine ließen sich durch Färbung mit dem Farbstoff Coomassie-Brilliantblau G250 sichtbar machen. Die Nachweisgrenze liegt bei 0,3 bis 1 µg Protein je Bande. Das Gel wurde mindestens 30 min in der Färbelösung geschwenkt und anschließend in der Entfärbelösung gespült, bis der Hintergrund genügend entfärbt war. Anschließend wurde das Gel fotografiert und getrocknet. Zum Trocknen wurde das Gel 30 min in Geltrocknungslösung inkubiert, zeitgleich wurden zwei Zellophan-Folien in Wasser eingeweicht. Nach Ablauf der Inkubation wurde das Gel luftblasenfrei zwischen den Zellophanfolien im Geltrocknungsrahmen aufgespannt und bei 37 °C bis zur vollständigen Trockenheit getrocknet.

Von einigen auf Proteinexpression zu untersuchenden Klonen wurden 5 ml Übernachtskulturen angefertigt. Aus diesen wurden am darauf folgenden Tag 20 ml Flüssigkultur im Maßstab 1:100 angeimpft. Diese wurden bei 37 °C bis zum Erreichen des optimalen Induktionszeitpunktes unter Schütteln wachsen gelassen. Anschließend wurde durch Zugabe von IPTG die Proteinexpression induziert. Vor Induktion wurde je 1 ml der Kultur als Probe entnommen und, wie oben beschrieben, als Probe SN 0 aufgearbeitet. Die Hauptkultur wurde durch Zentrifugieren (10 min, 4300 x g, 4 °C) pelletiert und in 300 µl Puffer B (pH 8.0) aufgenommen. Durch gründliches Verwirbeln wurden die Zellen lysiert. Anschließend wurde die Probe bei 10600 x g für 10 min zentrifugiert und 20 µl des Überstandes als Probe SN1, wie oben beschrieben, aufgearbeitet. Der verbliebene Überstand wurde zu 200 µl gereinigter Nickel-NTA-Agarose gegeben und für 30 min bei RT auf einem Eppendorfschüttler mit maximaler Geschwindigkeit geschüttelt, anschließend bei 10600 x g für 1 min bei RT zentrifugiert und als Probe SN2 aufgearbeitet. Zu der Nickel-NTA-Agarose wurden 300 µl Puffer C (pH 6.3) gegeben, für 10 min bei RT auf einem Eppendorfschüttler mit maximaler Geschwindigkeit geschüttelt, anschließend bei 10600 x g für 1 min bei RT zentrifugiert und

als Probe SN3 aufgearbeitet. Diese Prozedur wurde mit 300 µl Puffer D (pH 5.9) (Überstand = SN4), 3 x 300 µl Puffer E (pH 4.5) (Überstand = SN5.1, 5.2, 5.3) und 300 µl Puffer F (pH 2.5) (Überstand = SN6) wiederholt. Nach Zugabe von 2 µl 6 x SDS-Gelladepuffer zu 10 µl jeden Überstandes und 5minütigem Erhitzen bei 95 °C wurden die Überstände zur Analyse des Proteingehalts vor und nach Aufreinigung mittels SDS-PAGE analysiert.

2.3.3 Proteinexpression und Aufreinigung im präparativen Maßstab

Die Expression von Proteinen im präparativen Maßstab dient der Reinigung einer größeren Menge Protein, die für eine anschließende Immunisierung von Mäusen oder Kaninchen verwendet werden kann. Zur affinitätschromatographischen Aufreinigung wurde Nickel-NTA-Agarose verwendet. Das rekombinante Protein kann mit einem pH-Stufengradient eluiert werden. Zur Reinigung der rekombinanten Proteine wurde die MPLC-Anlage "*Econo System*" von BioRad eingesetzt. Diese Anlage besteht aus einem Steuergerät mit Peristaltikpumpe, Spektrophotometer, Fraktionssammler und einem angeschlossenen Schreiber, der permanent die optische Dichte bei $\lambda=280$ nm dokumentiert.

Von einem einzelnen, bereits auf Proteinexpression untersuchten Klon, wurde eine 5 ml Übernachtskultur angefertigt. Aus dieser wurden am darauf folgenden Tag 200 ml Flüssigkultur im Maßstab 1:100 angeimpft. Diese wurde bei 37 °C bis zum Erreichen des optimalen Induktionszeitpunktes unter Schütteln wachsen gelassen. Anschließend wurde durch Zugabe von IPTG die Proteinexpression induziert. Die eingesetzte Endkonzentration an IPTG sowie die anschließende Inkubationszeit und die dabei gewählte Temperatur richteten sich nach den bei der Proteinexpression im analytischen Maßstab optimierten Bedingungen. Vor Induktion und nach Ablauf der Inkubationszeit wurde je 1 ml der Kultur als Probe entnommen und, wie unter 2.3.2 beschrieben, aufgearbeitet. Die Hauptkultur wurde durch Zentrifugieren (10 min, 4300 x g, 4 °C) pelletiert, der Überstand verworfen und das Pellet in 20 ml Puffer A mit 10 mM β -Mercaptoethanol schaumfrei resuspendiert und üN bei 4 °C langsam gerührt. Am nächsten Tag wurden unlösliche Zellbestandteile durch Zentrifugieren (32800 x g, 30 min, 4 °C) abgetrennt. Der klare Überstand enthielt das zu reinigende Protein. Eine mit 10 ml Nickel-NTA gefüllte Säule wurde zum Verdichten üN bei 4 °C stehen gelassen. Da das Säulenmaterial unter 30 % Ethanol gelagert wurde, musste es vor der Proteinaufreinigung gründlich mit Wasser gespült und anschließend mit Puffer A äquilibriert werden. Die Spülung mit Puffer A erfolgte so lange, bis die OD₂₈₀ konstant blieb (Basislinie). Beim Erreichen dieser Basislinie wurde das Spektrophotometer abgeglichen. Der Überstand wurde jetzt auf die Säule aufgetragen. Dann wurde die Säule mit Puffer B bei einer Flussrate von 0,3 bis 0,5 ml/min gewaschen, bis die Basislinie wieder erreicht war. Vom Durchfluss wurde ein 500 µl-Aliquot für die SDS-PAGE gesammelt. Die weiteren Waschschrte mit Puffer C und D erfolgten wie bereits beschrieben und wurden ebenfalls gesammelt. Mit Puffer E wurde das Protein von der Säule eluiert. Der Durchfluss wurde in 500 µl-Aliquots für die SDS-PAGE und anschließende weitere Aufreinigung gesammelt. Der folgende Waschschrte mit Puffer F wurde wieder wie oben beschrieben durchgeführt.

Die Fraktionen des Eluats (Puffer E) wurden wie unter 2.3.2 einer SDS-PAGE unterzogen. Die Fraktionen mit den höchsten Konzentrationen des gewünschten Proteins wurden anschließend aufgereinigt. Dabei wurden die Proteine in einem Polyacrylamidgel nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt und kontinuierlich eluiert. Auf diese Art können Kontaminationen, etwa durch noch vorhandene bakterielle Proteine oder rekombinante Proteine, die keine Volllängenprodukte darstellen, abgetrennt werden. Für die Gelfiltration wurde eine *Mini Prep Cell*-Anlage eingesetzt. Hierbei handelt es sich um ein diskontinuierliches Polyacrylamid-Elektrophoresesystem mit kontinuierlicher Elution der Proteine aus einem 7,5 bis 15%igen Polyacrylamidgel nach Laemmli. Die zu reinigende Probe wurde mit der entsprechenden Menge an 6 x SDS-Gelladepuffer versetzt und auf die Oberfläche des Gels aufgetragen. Die Probe wanderte bei einer Stromstärke von 5 mA durch das Gel, wurde am unteren Ende eluiert und mit Hilfe eines Fraktionssammlers in Fraktionen zu je 300 µl gesammelt. Von den gesammelten Fraktionen wurden je 20 µl in einer SDS-PAGE analysiert. Die Proben mit der höchsten Proteinkonzentration wurden anschließend umgepuffert.

2.3.4 Umpuffern und Konzentrierung von Proteinen

Zur Umpufferung von Proteinen in 1 x PBS wurden NAPTM-25 Säulen verwendet. Die Säule wurde mit 25 ml 1 x PBS gewaschen, dann wurden 2,5 ml der Probe aufgetragen und mit 3,5 ml 1 x PBS wieder von der Säule eluiert. Die Konzentrierung wurde unter Verwendung von *Centricon* Mikrokonzentratoren durchgeführt. Dabei wurde die zu konzentrierende Probe auf eine Ultrafiltrationseinheit in einem Eppendorfgefäß gegeben. Am unteren Ende dieser Ultrafiltrationseinheit befindet sich eine niedrig adsorbierende Membran, welche Lösungen und Moleküle < 10 kDa passieren lässt. Durch Zentrifugation bei 15300 x g wurde die proteinhaltige Lösung konzentriert. Der Grad der Konzentration richtet sich nach der Zentrifugationszeit.

2.3.5 Konzentrationsbestimmung von Proteinen

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Konzentrationsbestimmung nach der Bradford-Methode (Bradford, 1976) mit dem *Bio-Rad Protein Assay* durchgeführt. Durch Bindung des Farbstoffes Coomassie-Brilliantblau G250 an hauptsächlich basische und aromatische Aminosäuren der Proteine kommt es zu einer Verschiebung des Absorptionsmaximums des Farbstoffes von $\lambda = 465$ nm zu $\lambda = 595$ nm, welche mit dem Spektrophotometer gemessen werden kann. Die gemessene Extinktion ist dabei direkt proportional zur Proteinkonzentration in der Lösung. Ausgehend von einer BSA-Stammlösung (100 µg/ml) wurde eine Standardreihe von 20,0 µg/ml bis 2,5 µg/ml BSA in Schritten von 2,5 µg/ml angefertigt. Dazu wurde die entsprechende Menge BSA mit 1 x PBS auf 400 µl aufgefüllt. Die zu messenden Proben wurden 1:200 und 1:400 mit 1 x PBS verdünnt. Nun wurde zu jeder Probe 100 µl Bradfordlösung (Endvolumen 500 µl) gegeben. Nach 30 min konnten die Proben im Spektrophotometer bei $\lambda = 595$ nm vermessen werden. Mit den Standardwerten ließ sich eine Eichgerade erstellen, aus der der Proteingehalt der Proben direkt ermittelt wurde.

2.4 Bestätigung der Expression ausgewählter Kandidatengene

2.4.1 RNA-RNA-*in situ*-Hybridisierung

2.4.1.1 Linearisierung der verwendeten Plasmid-DNA

Mit der Methode der RNA-RNA-*in situ*-Hybridisierung lassen sich Expressionsstärke und Lokalisation der Transkripte eines bestimmten Gens nachweisen. Mit Hilfe verschiedener RNA-Polymerasen kann ein *in vitro*-Transkript in Gegenrichtung des klonierten offenen Leserahmens (*antisense*) hergestellt werden. Dieses wurde zur Hybridisierung von Gewebeschnitten benutzt. Für die *in vitro*-Transkription wurde linearisierte Plasmid-DNA als Ausgangsmaterial verwendet. Dazu wurde das Plasmid durch Restriktionsendonukleasen direkt nach dem klonierten offenen Leserahmen gespalten. Als Kontrollreaktion wurde ein *in-vitro*-Transkript mitgeführt, das in Richtung des klonierten offenen Leserahmens (*sense*) synthetisiert wurde.

Restriktionsansatz:	
1 µg/µl Plasmid-DNA	30,00 µl
10x <i>EcoR</i> I-Puffer bzw. <i>BamH</i> I-Puffer bzw. Puffer 3	20,00 µl
1 U/µl <i>EcoR</i> I bzw. <i>BamH</i> I bzw. <i>Not</i> I	60 + 30 µl
100x BSA	2,00 µl
<u>A. bidest</u>	<u>58,00 µl</u>
gesamt	200,00 µl

Die Restriktion erfolgt 1 h bei 37 °C mit 60 U Enzym und weitere 30 min mit zusätzlichen 30 U Enzym. Bei der anschließenden Phenol-Chloroform-Extraktion wurde zum Restriktionsansatz 1 Volumen Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) gegeben. Die Probe wurde durch Verwirbeln gemischt und danach 5 min mit 20800 x g bei RT zentrifugiert. Die obere wässrige Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt, mit einem Volumen Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) versetzt und nochmals zentrifugiert. Zur Fällung der linearisierten DNA wurden zur oberen wässrigen Phase in einem neuen Reaktionsgefäß 1/10 Volumen 3M Natriumacetat (pH 5,2) und 2 Volumen 96 %iges Ethanol gegeben, gemischt und 15 min bei –80 °C inkubiert. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation von 20 min mit 20800 x g bei 4 °C. Das DNA-Pellet wurde mit 500 µl 70%igem Ethanol für 5 min bei 20800 x g und 4 °C gewaschen. Anschließend wurde das Pellet kurz getrocknet und in 50 µl 1 x TE aufgenommen. Die Endkonzentration der linearisierten DNA betrug ca. 0,5 µg/µl. Zur Kontrolle der Reaktion wurde 1 µl Probe elektrophoretisch aufgetrennt. Als Längenmarker diente die 1 kb Leiter.

2.4.1.2 *In vitro*-Transkription zur Sondenherstellung

Für die *in vitro*-Transkription wurde das *Riboprobe Combination System-T3/T7* verwendet.

Transkriptionsansatz:	
5x Transkriptionspuffer	4,00 µl
100mM DTT	2,00 µl
10 U/µl <i>RNasin Ribonuclease Inhibitor</i>	2,00 µl
rATP, rGTP, rCTP (je 2,5 mM)	3,00 µl
nukleasefreies Wasser	1,00 µl

linearisierte Template-DNA	1,00 µl
α -P ³³ rUTP	5,00 µl
10 U/ µl T3 o. T7 RNA-Polymerase	2,00 µl
gesamt	20,00 µl

Die *in vitro*-Transkription erfolgte für 1 h bei 37 °C. Anschließend wurde das Ausgangs-plasmid durch einen 15minütigen DNase-Verdau mit 1 U *RQ1-DNase* bei 37 °C entfernt. Zur Verringerung der Sondengröße auf 100-200 bp wurde die Sonde einer alkalischen Hydrolyse unterzogen. Das Probenvolumen wurde mit A. bidest. auf 100 µl erhöht. Dann erfolgten die Zugabe von 50 µl 0,4 M NaHCO₃ und 50 µl 0,6 M Na₂CO₃ und eine Inkubation bei 60 °C. Die Dauer der alkalischen Hydrolyse ist abhängig von der Sondengröße. Die Reaktion wurde anschließend mit 1,3 µl Eisessig abgestoppt. Zur Fällung der RNA wurden zur Probe 5 µl t-RNA (10 mg/ml), 6,6 µl 3 M Natriumacetat (pH 5,2) und 500 µl eiskaltes 96%iges Ethanol gegeben. Die Probe wurde 2 h bei -20 °C inkubiert und dann 15 min bei 20800 x g und 4 °C zentrifugiert. Das RNA-Pellet wurde mit 75 % Ethanol (-20 °C) durch 5minütige Zentrifugation bei 20800 x g und 4 °C gewaschen. Das Pellet wurde kurz getrocknet und in 20 µl deionisiertes Formamid aufgenommen. Zur gelösten RNA wurden 180 µl Hybridisierungslösung, vorgewärmt auf 42 °C, gegeben, anschließend wurde die Einbaurate an α -P³³rUTP in die RNA-Probe im *Coulter Counter* vermessen.

2.4.1.3 Fixierung und Hybridisierung des Untersuchungsmaterials

Es wurden 5 µm dicke Gewebeschnitte angefertigt und je 2 auf silanisierte Objektträger aufgezogen. Der erste, mittlere und letzte der im Experiment verwendeten Reihe an Schnitten wurde zur Kontrolle für eine HE-Färbung verwendet. Die Objektträger wurden 15 min in 4 % Paraformaldehyd / 2 x SSPE auf Eis fixiert. Dann folgte eine Dehydrierung in 70 % Ethanol auf Eis für 15 min und anschließend in 96 % Ethanol bei RT für 2 min. Die Behandlung mit *Proteinase K* (Endkonzentration 0,5 µg/µl) erfolgte für 10 min bei 37 °C und wurde mit 0,1 M Glycin / 2 x SSPE abgestoppt. Zur Nachfixierung wurden die Objektträger 10 min auf Eis in 4 % Paraformaldehyd / 2 x SSPE und anschließend 5 min in 50 % Formamid / 2 x SSPE bei RT inkubiert. Die nachfolgende Acetylierung 2 x 5 min in 2 x SSPE / Triethanolamin mit 2 x 375 µl Essigsäureanhydrid verminderte Hintergrundsignale. Im Anschluß wurden die Objektträger 5 min in 50 % Formamid / 2 x SSPE gewaschen.

Die Gewebeschnitte wurden mit je 20 µl Hybridisierungslösung (vorgewärmt auf 42 °C) in einer feuchten Kammer (50 % Formamid / 2 x SSPE) hybridisiert. Die Vorhybridisierung erfolgte bei 42 °C über 1 – 3 h. Dann wurde die radioaktiv markierte Probe auf den Gewebeschnitten verteilt, so dass auf jedem Objektträger ein Gewebeschnitt mit dem *in vitro*-Transkript in Richtung des offenen Leserahmens (*sense*) und der zweite Gewebeschnitt mit dem *in vitro*-Transkript in Gegenrichtung zum offenen Leserahmen (*antisense*) hybridisierte. Die Hybridisierung erfolgte üN bei einer vom GC-Gehalt der verwendeten RNA abhängigen Temperatur. Zum Waschen wurden die Objektträger mit 50 % Formamid / 2 x SSPE gespült, dann 30 min in 50 % Formamid / 2 x SSPE bei 50 °C und 10 min in 2 x SSC / 0,1 % SDS bei 37 °C schüttelnd inkubiert. Alle einzelsträngigen, d.h. nicht hybridisierten RNAs wurden durch Inkubation mit 50 µg/ml *RNase A* für 30 min in 2x SSC / 0,1 % SDS bei 37 °C abgebaut. Anschließend wurden die Objektträger 30 min mit 50 % Formamid / 0,5 x SSC /

0,1 % SDS bei 37 °C schüttelnd gewaschen. Danach wurden die Objektträger zur Dehydrierung 10 min in 50 % Ethanol / 0,3 M Ammoniumacetat, 10 min in 70 % Ethanol / 0,3 M Ammoniumacetat, 5 min in 95 % Ethanol / 0,3 M Ammoniumacetat und 5 min in 96 % Ethanol inkubiert und anschließend getrocknet.

Zum Sichtbarmachen der Hybridisierung wurden die Objektträger in auf 42 °C erwärmte Filmemulsion getaucht und zur Exposition bei 4 °C für 14 Tage lichtdicht gelagert. Dann wurde die Filmemulsion entwickelt. Anschließend wurden die Objektträger HE gefärbt, gespült und mit Gelatine eingedeckt. Die folgende mikroskopische Auswertung erfolgte im Hell- und Dunkelfeld.

2.4.2 Immunhistochemie an Gefrierschnitten

Die immunhistochemische Anfärbung erfolgte unter Zuhilfenahme des *Dako StreptABC-Kits*. Gewebeschnitte mit einer Stärke von 5 µm wurden 10 min auf Eis in Aceton fixiert und anschließend getrocknet. Die Schnitte wurden dann 7 min in 0,6 % Wasserstoffperoxid / Methanol inkubiert, anschließend mit Wasser gespült und 5 min in 1 x TBS / 0,1 % Tween 20 gewaschen. Zum Blocken unspezifischer Bindungen wurden die Schnitte 20 min in Ziegenerum (1:5 verdünnt in 1 x PBS) inkubiert. Anschließend folgte die spezifische Bindung des Primärantikörpers (Verdünnung entsprechend Herstellerprotokoll und Optimierung) bei 4 °C üN. Die spezifischen Bindungen wurden dann durch einen Sekundärantikörper sichtbar gemacht. Nach einem Waschschrift von 3 x 5 min in 1 x TBS / 0,1 % Tween 20 wurden die Gewebeschnitte mit dem entsprechenden biotinylierten Sekundärantikörper (Ziege) 30 min bei RT inkubiert und anschließend wieder wie oben gewaschen. Dann wurden sie 30 min bei RT mit dem StreptABC-Komplex / HRP inkubiert und gewaschen. Die Reaktion mit dem Farbsubstrat (Chromogen-Substratlösung für Peroxidase) erfolgte während einer 15minütigen Inkubation bei RT. Die Objektträger wurden nach einem weiteren Waschschrift mit Hämatoxilin-Eosin gefärbt, gespült und mit Gelatine eingebettet.

2.4.3 Immunfluoreszenz an kultivierten adhärennten Säugetierzellen

Mit dieser Methode lassen sich Proteine durch spezifische Antikörper in oder auf verschiedenen Zelllinien nachweisen. Die Detektion erfolgt über an Sekundärantikörper gekoppelte Fluoreszenzfarbstoffe. Diese emittieren nach Anregung mit UV-Licht eines definierten Spektralbereiches Licht und lassen dadurch unter dem Mikroskop eine Lokalisationsbestimmung der zu untersuchenden Proteine in der Zelle zu. Dieser Test wurde verwendet, um die Spezifität der hier benutzten Antikörper zu bestätigen.

Transfizierte Zellen wurden in vorher bestimmter optimaler Zelldichte auf Chamber Slides ausgesät und üN im Brutschrank inkubiert. Am nächsten Tag wurde das Medium entfernt und die Zellen für 2 min mit eiskaltem 1 x PBS gewaschen. Die anschließende Fixierung der Zellen erfolgte für 2 x 5 min in einem eisgekühlten Gemisch aus Methanol und Aceton im Verhältnis 1:1. Zur Verringerung unspezifischer Antikörperbindung wurden die Zellen mit Ziegenerum, 1:5 verdünnt in 1 x PBS, für 30 min bei RT inkubiert. Nach dem Serum wurde der Primärantikörper auf die Zellen gegeben. Die Inkubation erfolgte für eine Stunde bei RT. Nach 3maligem Waschen für 5 min mit 1 x TBST wurde der fluoreszenzmarkierte Sekundär-

antikörper zugegeben und für 30 min bei RT im Dunkeln inkubiert. Abschließend wurde nochmals gewaschen und die Zellen dann leicht getrocknet. Als Einbettmedium diente *Anti-fade* mit Propidiumjodid. Die Objektträger wurden anschließend am Lichtmikroskop ausgewertet.

2.4.4 Northern-Blot zur Detektion von mRNA aus eukaryontischen Zellen

2.4.4.1 Isolierung von RNA aus adhärenenten Zellkulturen

Für die Extraktion von Gesamt-RNA wurden ca. 1×10^6 Zellen eingesetzt. Nach einem Waschschrift mit eiskaltem 1 x PBS wurden die Zellen mit 1 ml TRIZOL-Reagenz benetzt und mit einem Schaber von der Kulturschale abgelöst. Die RNA-Extraktion erfolgte nach den Angaben des Herstellers. Die RNA wurde in nukleasefreiem Wasser durch 10minütige Inkubation bei 65 °C gelöst und anschließend die Konzentration spektrophotometrisch bestimmt. Die Aufbewahrung der gelösten RNA erfolgte bei -80 °C.

2.4.4.2 Northern-Blot

5 µg Gesamt-RNA und 3 µg RNA-Leiter wurden in einem Volumen von 5 µl mit 15 µl RNA-Denaturierungspuffer 10 min bei 65 °C erhitzt, dann auf Eis abgekühlt und anschließend wurden 4 µl 6x RNA-Ladepuffer zugegeben. Die Auftrennung der RNA erfolgte in 1%igen Agarosegelen, als Gel- und Laufpuffer diente 1 x MOPS-Puffer. Ethidiumbromid wurde dem Gel in einer Konzentration von 1 µg/ml vor dem Gießen zugegeben. Die Spannung für den Gellauf richtet sich nach dem Abstand der Elektroden in der Gelkammer und beträgt 1 - 5 V/cm. Im Anschluss an die elektrophoretische Auftrennung wurde das Gel 3 x 15 min und eine positiv geladene Nylonmembran 1 x 15 min in 10 x SSC äquilibriert. Danach erfolgte die Übertragung der RNA auf die Membran unter Vakuum (5 Hg, 1 h 30 min). Anschließend wurde die Membran in 2 x SSC gewaschen und getrocknet. Durch Bestrahlung mit UV-Licht bei 125 mJ wurde die RNA kovalent an die Membran gebunden.

2.4.4.3 Sondenmarkierung

Als Ausgangsmaterial zur Sondenmarkierung wurden die, wie unter 2.2.2 beschrieben hergestellten PCR-Produkte verwendet. Die radioaktive Markierung erfolgte mit dem Random primed DNA Labeling Kit. Es wurden 20 ng DNA mit A. bidest. auf 11,5 µl aufgefüllt, 10 min bei 99 °C denaturiert und anschließend auf Eis abgekühlt. Dazu wurden je 1 µl dGTP, dCTP, dTTP, 2 µl Reaktionsgemisch, 2,5 µl α -³²PdATP und 1 µl *Klenow*-Enzym gegeben. Die radioaktive Markierung erfolgte bei 37 °C für 30 min. Anschließend wurden nicht eingebaute Nukleotide über G-50 Sephadex Säulen abgetrennt und die Einbaurrate an α -³²PdATP in die DNA-Probe im *Coulter Counter* vermessen.

2.4.4.4 Hybridisierung

Die Vorhybridisierung wurde mit 5 - 10 ml Hybridisierungslösung bei 42 °C für 3 h rotierend mit 5 - 7 U/min im Hybridisierungssofen durchgeführt. Die Hybridisierung erfolgte mit 5 ml

Hybridisierungslösung und der markierten Sonde für 48 h bei 42 °C und 5 - 7 U/min. Gewaschen wurden die Membranen anschließend 3 x 30 min mit je 200 ml 2 x SSC / 0,1 % SDS bei 68 °C, rotierend mit 12 U/min. Die Exposition mit einem Röntgenfilm erfolgte üN bei -80 °C und anschließend, abhängig von der Signalintensität, über einen längeren Zeitraum.

2.4.5 Western-Blot zur Detektion von Proteinen aus eukaryontischen Zellen

2.4.5.1 Isolierung von Proteinen aus adhärenenten Zellkulturen

Für die Extraktion von Proteinen wurden ca. 1×10^6 Zellen eingesetzt. Nach einem Waschschrift mit eiskaltem PBS wurden die Zellen trypsiniert, bei 300 x g und 4 °C für 5 min zentrifugiert, in 1 ml 1 x PBS resuspendiert und wieder zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 100 µl Lysepuffer und 15 µl Proteaseinhibitor resuspendiert. Nach Zugabe von 5 µl Benzonnase wurde die Reaktion 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden ungelöste Zellbestandteile bei 10600 x g, 4 °C für 10 min zentrifugiert und der Überstand in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Nach dem Bestimmen der Proteinkonzentration konnte die Proteinlösung bei -20 °C aufbewahrt werden.

2.4.5.2 Western-Blot

Durch eine diskontinuierliche SDS-PAGE wurden die gewünschten Proteinlösungen unter denaturierenden Bedingungen in zwei parallelen Gelen aufgetrennt. Ein Gel wurde nach der Coomassie-Färbung zu Dokumentationszwecken getrocknet. Aus dem zweiten Gel wurden die Proteine auf eine PVDF-Membran übertragen. Dafür wurde die Technik der elektrophoretischen Elution der Proteine im Semi-Dry-Verfahren unter Verwendung der Trans-Blot®SD Apparatur angewendet.

<u>Aufbau des Blots:</u>	Anode (+)	2 Lagen Whatman-Papier, getränkt in Transferpuffer
	Membran	
	Gel	
	Kathode (-)	2 Lagen Whatman-Papier, getränkt in Transferpuffer

Die Spannung während des Blots betrug für ein Minigel (8 x 5,5 cm) 10-15 V. Nach 30 min wurde der Blot beendet und die PVDF-Membran wurde zur Kontrolle 5 min in Ponceau-S-Rot gefärbt, anschließend in Wasser gewaschen und zur Dokumentation fotografiert. Der Blot wurde dann üN bei 4 °C in Milchpulverlösung geschwenkt. Dies diente dem Blockieren freier Bindungsstellen auf der Membran. Nach der Blockierung wurde die Membran kurz in 1 x TBS gespült und dreimal 5 min in 1 x TBST gewaschen. Nach Entfernen der Waschlösung wurde die Membran üN bei 4 °C in der Erstantikörperlösung inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Membran 3 x 5 min in 1 x TBST gewaschen und anschließend mit dem Zweitantikörper (Peroxidase-gekoppelt) in 10 ml Lösung (Verdünnung nach Angaben des Herstellers) 2 h bei RT unter leichtem Schwenken inkubiert. Nach weiteren Waschschriften (siehe oben) erfolgte die Detektion der gebundenen Antikörper durch *ECL™ Western Blotting Detection Reagents* nach Herstellerangaben. Die Exposition der Membran wurde auf *Hyperfilm MP* entsprechend der Signalstärke für 5 bis 30 min durchgeführt.

2.5 Funktionelle Analysen

2.5.1 Der Expressionsvektor pBK-CMVΔ

Der verwendete Expressionsvektor pBK-CMVΔ erlaubt durch den CMV-Promotor eine starke Proteinexpression in eukaryontischen Zellen. Der Vektor wurde im Labor zur Optimierung für diese Anwendung verändert. Durch Deletion des prokaryontischen Promotors im Bereich *Nhe* I / *Spe* I sollte die Expression der Proteine in eukaryontischen Zellen weiter verbessert werden.

2.5.2 Kultivierung von adhärenenten Säugerzellen

Die in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien wurden als adhärenent wachsende einlagige Kulturen bei 37 °C und 5 % CO₂ in Kunststoff-Gewebekulturflaschen (25, 75 cm²) oder -schalen (96-, 24-, 12-, 6-Loch-Platten und 6 cm²-, 10 cm²-Schalen) kultiviert. Alle drei bis vier Tage wurde verbrauchtes Medium durch Frisches ersetzt. Bei einer Konfluenz der Zellen von ca. 80 % wurden sie unterkultiviert. Nach Entfernen des Mediums und Spülen mit 10 ml 1 x PBS (75 cm²-Kulturflasche) wurden die Zellen mit 4 ml Trypsin-EDTA-Lösung gespült. Dann wurden die Zellen mit 2 ml Trypsin-EDTA-Lösung im Brutschrank inkubiert, bis sie sich vom Kulturflaschenboden lösten. Nach Neutralisieren der Trypsin-Aktivität durch Zugabe der 5fachen Menge an Medium und Vereinzeln der Zellen durch wiederholtes vorsichtiges Pipettieren wurden die Zellen im Verhältnis 1:2 bis 1:16 in entsprechende neue Kulturgefäße ausgesät. War für ein Experiment eine bestimmte Zellzahl erforderlich, wurden die Zellen mit Trypan-Blau gemischt (1:1) und in der Neubauer-Zählkammer gezählt. Anhand der so ermittelten Zellzahl konnte die Zellzahl pro ml errechnet werden.

Adhärenente Säugerzellen können zur Konservierung in flüssigem Stickstoff eingefroren werden. Die exponentiell wachsenden Zellen (75 cm²-Kulturflasche mit ca. 1x10⁷ Zellen) wurden trypsiniert, in Medium aufgenommen und durch Zentrifugation (300 x g, 5 min, 4 °C) pelletiert. Das Zellpellet wurde anschließend in 3 ml Einfriermedium resuspendiert, in Aliquots zu je 1 ml in Einfrier Röhrchen gegeben und diese in Zellstoff verpackt langsam auf -80 °C abgekühlt. Die Zellen wurden anschließend in flüssigem Stickstoff aufbewahrt. Zur Wiederaufnahme einer Kultur wurden die Zellen sofort nach Entnahme aus dem flüssigen Stickstoff aufgetaut und in 5 ml vorgewärmtem Medium vorsichtig resuspendiert. Danach wurde die Zellsuspension zentrifugiert (300 x g, 5 min, 4 °C), das Pellet in frischem Medium aufgenommen und die Zellen in einer 25 cm²-Kulturflasche kultiviert.

2.5.3 Transfektion und Selektion von adhärenenten Säugerzellen

Die in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien wurden mittels Elektroporation transfiziert. Verwendet wurde hierfür der „Cell Line Nucleofection Kit V“ und das Elektroporationsgerät NucleofectorTM. Durch die Elektroporation mit diesem System können Transfektionseffizienzen von über 50 % erreicht werden. Die Elektroporationsbedingungen wurden für jede Zelllinie anhand des Reporterproteins EGFP optimiert. Die zu transfizierenden Zellen wurden trypsiniert und gezählt. 1x10⁶ Zellen wurden 5 min bei 300 x g, 4 °C zentrifugiert und in

100 µl *supplemented Nucleofection Solution V* resuspendiert. Nach der Zugabe von 2 µg Plasmid-DNA wurden die Zellen mit dem entsprechenden Elektropuls transfiziert.

Zelllinie	Programm
A-431	T-27
BT 474	T-27
KS wt	T-27
MCF 7	P-24
MFM 223	P-24
EFM-19	T-27
SKB-R3	T-27
MCF 10a	G-16

Die transfizierten Zellen wurden mit 500 µl RPMI 1640 gemischt und dann im jeweiligen vorgewärmten Wachstumsmedium aufgenommen. Dann konnten die Zellen im benötigten Kulturgefäß kultiviert werden. Zur Selektion auf Transfektanten wurde nach 24 h Wachstum das Medium gegen 10 ml Selektionsmedium mit Geneticin (die Konzentration des Selektionsmittels ist abhängig von der jeweiligen Zelllinie) ausgetauscht. Die Selektion wurde über 2 Wochen mit 3tägigem Mediumwechsel durchgeführt.

Geneticin-Konzentration:

A-431	800 µg/ml
BT 474	1200 µg/ml
EFM 19	900 µg/ml
KS wt	800 µg/ml
MCF 7	800 µg/ml
MCF 10a	700 µg/ml
MFM 223	800 µg/ml
SKB-R3	500 µg/ml

Die Bestimmung der Transfektionseffizienz erfolgte am Durchflußzytometer im Fluoreszenzkanal 1. Die transfizierten Zellen wurden nach 24 h Wachstum trypsiniert, 5 min bei 300 x g, 4 °C zentrifugiert, in 100 µl 1 x PBS resuspendiert und zur Fixierung mit 100 µl 5 % Formaldehyd versetzt. Bis zur Messung der Transfektionseffizienz konnten die Zellen bei 4 °C aufbewahrt werden.

2.5.4 Invasionsanalyse

Die Invasionsanalyse stellt ein System dar, um die Fähigkeit von Tumorzellen zur Invasion durch eine Basalmembran (Matrigel) zu untersuchen. Mit dieser Methode kann man den Effekt von verschiedenen Faktoren auf die Invasivität von Zellen quantitativ bestimmen. In dieser Arbeit sollte der Einfluss von in stabil transfizierten Mammakarzinomzelllinien exprimierten Genprodukten auf die Invasivität der Zellen untersucht werden. Die Invasionsanalyse wurde nach Albini et al., 1987 durchgeführt. Die Transfektionen erfolgten mit dem „*Cell Line Nucleofection Kit V*“. Die transfizierten Zellen wurden auf 6er-Schalen mit je 5 ml Medium verteilt. Nach 24 h Wachstum erfolgte der Austausch des normalen Mediums gegen 5 ml Selektionsmedium mit Geneticin. Die Selektion wurde über 2 Wochen mit 3tägigem Mediumwechsel durchgeführt. Danach wurden die Zellen in die Invasionsanalyse eingesetzt. Das Experiment wurde im Duplikat durchgeführt. Für diese Analyse wurden Kunststoffgefäße mit einem Boden aus einer Polykarbonatmembran mit 8 µm großen Poren mit Matrigel

beschichtet und in 24-Loch-Platten eingesetzt. Die Beschichtung erfolgte mit 400 µl in Medium verdünntem Matrigel (Endkonzentration 25 µg/ml) durch Inkubation von 6 h im Brutschrank. Die Zellen wurden trypsinisiert und mit Trypan-Blau gezählt. 1×10^5 Zellen wurden in 250 µl serumfreiem Medium resuspendiert. Die Löcher einer 24-Loch-Platte wurden mit 200 µl Medium mit 10 % FCS gefüllt, die Einsätze luftblasenfrei aufgesetzt und die 250 µl Zellsuspension auf das Matrigel pipettiert. Nach 4 h Inkubation im Brutschrank erfolgte die Fixierung und Färbung der invasiven Zellen. Die Einsätze wurden in 75 % eiskaltem Ethanol bei 4 °C für 20 min fixiert, dann wurden Matrigel und nichtmigrierte Zellen mit einem Wattestäbchen gründlich entfernt und die Einsätze getrocknet. Anschließend wurden die Einsätze 25 min bei RT mit Kristallviolett (1 mg/ml) gefärbt, gewaschen und getrocknet. Zur Analyse der Invasivität wurden die gefärbten Zellen in 100 µl 10 % Essigsäure lysiert und die optische Dichte der Lösung bei 600 nm bestimmt. Die Kontrolltransfektion mit EGFP wurde nach 24 h Wachstum auf einer 10er-Schale für die Bestimmung der Transfektionseffizienz trypsinisiert und fixiert.

2.5.5 Proliferationsanalysen

2.5.5.1 Colorimetrische Bestimmung von Wachstumsraten

Mit dem Farbstoff WST-1 kann eine colorimetrische Analyse zur Bestimmung der Zellproliferation und Lebensfähigkeit von Zellen durchgeführt werden. Die Methode basiert auf der Fähigkeit mitochondrialer Dehydrogenasen, den hellroten Farbstoff WST-1 in Formazan (dunkelrot, Absorptionsmaximum bei $\lambda = 420-480$ nm) zu spalten. Mit dieser Analyse ist es möglich, den Effekt von exprimierten Genprodukten auf die Wachstumsrate von Zellen zu bestimmen. In dieser Arbeit sollten transient transfizierte Mammakarzinomzelllinien untersucht werden. Die Transfektionen erfolgten mit dem „*Cell Line Nucleofection Kit V*“. Zur späteren Bestimmung der Transfektionseffizienz wurde die Plasmid-DNA des gewünschten Gens für alle Transfektionen 1:10 mit EGFP gemischt. Die transfizierten Zellen wurden 5 min bei 300 x g, 4 °C zentrifugiert, in 500 µl Medium ohne Phenolrot resuspendiert und mit Trypan-Blau gezählt. Die Zellen wurden auf 1×10^5 lebende Zellen pro 100 µl Medium ohne Phenolrot eingestellt und in Triplikaten auf 96-Loch-Platten verteilt. Nach 24 h, 48 h und 72 h Inkubation bei 37 °C, 5 % CO₂ im Brutschrank erfolgte die Zugabe von 10 µl WST-1. Die spektrophotometrische Messung der Proliferation wurde 3 h nach WST-1-Zugabe bei einer Wellenlänge von $\lambda = 450$ nm (Referenz $\lambda = 630$ nm) durchgeführt. Zur Bestimmung der Transfektionseffizienz wurden die für die Proliferationsanalyse nicht verwendeten Zellen in einer 6-Loch-Platte mit 2 ml Medium für 24 h inkubiert, dann trypsinisiert und fixiert. Die Auswertung der Proliferationsanalysen erfolgte in Microsoft® Excel 2002 durch Berechnung des Anstiegs der aus den Messzeitpunkten resultierenden Geraden und anschließende statistische Auswertung.

2.5.5.2 Analyse des klonalen Wachstums

Mit dieser Methode ist es möglich, den Effekt von exprimierten Genprodukten auf das klonale Wachstum von Zellen zu bestimmen. In dieser Arbeit sollten stabil transfizierte Mammakarzinomzelllinien auf ihre Fähigkeit zu klonalem Wachstum untersucht werden. Der *Colony Formation Assay* wurde nach Reuter, S. et al, 1998 durchgeführt. Die Transfektionen erfolgten mit dem „*Cell Line Nucleofection Kit V*“. Die transfizierten Zellen wurden mit Trypanblau gezählt und je 1×10^5 Zellen auf 3 10er-Schalen mit 10 ml Medium verteilt. Nach 2wöchiger Selektion auf Transfektanten wurden die Schalen mit 1 x PBS gewaschen, mit 75 % eiskaltem Ethanol für 20 min auf Eis fixiert, anschließend wieder mit Wasser gewaschen und getrocknet. Die Färbung mit Kristallviolett (1 mg/ml) erfolgte für 20 min bei RT, anschließend wurden die Schalen gewaschen und getrocknet. Die erste Auswertung erfolgte fotografisch, danach wurden die gefärbten Zellen in 1 ml 10 % Essigsäure lysiert und die optische Dichte der Lösung bei 600 nm bestimmt. Die Kontrolltransfektion mit EGFP wurde nach 24 h Wachstum auf einer 10er-Schale für die Bestimmung der Transfektionseffizienz trypsinisiert und fixiert.

3 Ergebnisse

3.1 Validierung der Expression potentieller Tumorsuppressor- und Onkogene

3.1.1 Bereitstellung der cDNA-Klone und Haushaltsgene

Zunächst sollte die in den „*in silico*“-Analysen für Brust-Tumoren und -Normalgewebe ermittelte unterschiedliche Expression einiger potentieller Tumorsuppressor- und Onkogene auf mRNA-Ebene experimentell bestätigt werden. Als Grundlage dienten 42 cDNA-Klone, welche für Teilbereiche der 20 zu untersuchenden Gene kodieren (Gen-ID, Zugriffsnummer für den Genbankeintrag und Homologie der cDNA-Klone siehe Tabelle 13 im Anhang). Die DNA-Sequenz der cDNA-Klone wurde von metaGen überprüft. Als Analysemethoden zur Bestätigung der theoretischen Daten wurden cDNA-Dot-Blot und Echtzeit-PCR gewählt, da diese Methoden die Möglichkeit bieten, alle interessanten Gene parallel an vielen Patientenproben zu untersuchen. Die cDNA-Klone wurden nach Transfektion in *E. coli* JM101 vermehrt und mittels Plasmidpräparation aufgereinigt. Sie dienten als Grundlage zur Generierung genspezifischer PCR-Produkte (PCR-Primer siehe Tabelle 14), für cDNA-Dot-Blots und als Referenzstandard für die Echtzeit-PCR. Alle geeigneten DNA-Fragmente wurden nach einer Kontroll-PCR elektrophoretisch überprüft (siehe Abb. 7). In die folgenden Experimente wurden nur PCR-Produkte eingesetzt, die die erwartete Größe aufwiesen und unter den gewählten Reaktionsbedingungen eine Bande in hoher Konzentration ergaben. Für den cDNA-Dot-Blot wurden die ausgewählten PCR-Produkte aufgereinigt und in einer Konzentration von 10 ng/μl eingesetzt. Zur Echtzeit-PCR wurde je ein ausgewähltes spezifisches Primerpaar verwendet.

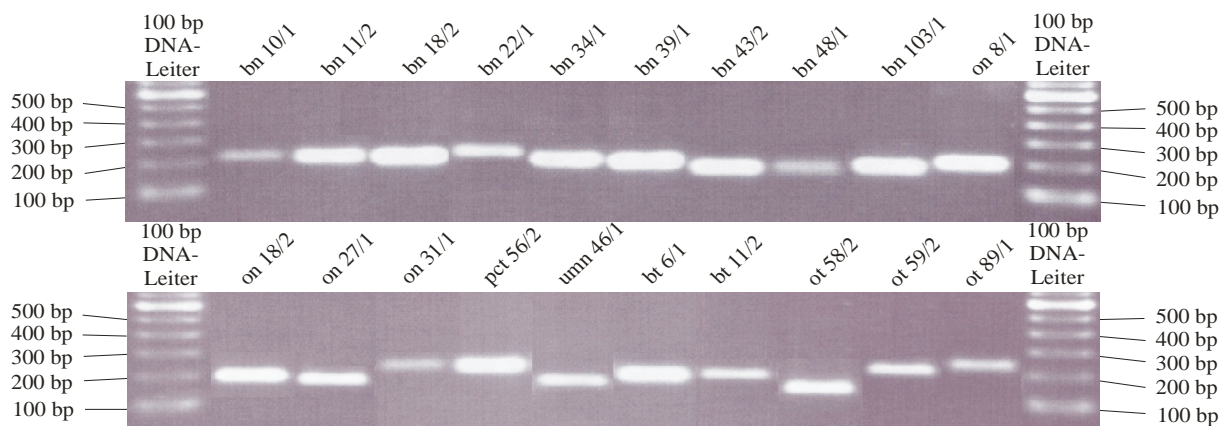


Abbildung 7: Elektrophoretische Auftrennung der ausgewählten spezifischen PCR-Produkte.

Um die Expression der untersuchten Gene in den verschiedenen Geweben vergleichen zu können, mussten sie auf der Basis von so genannten Haushaltsgenen normalisiert werden. Kloniert wurden dafür Fragmente von β -Aktin, β -Katenin, β -2-Mikroglobulin, basic protein, GAPDH, HPRT, Phospholipase A2, ribosomales Protein S9 und Tubulin. Diese Gene wurden mehrfach als Haushaltsgene mit gleich starker Expression in verschiedenen Geweben beschrieben (Battaglia et al., 1998; Wasserman et al., 1999; Goeminne et al., 1999). Angaben über Länge der klonierten Fragmente und Quellen für die Primer finden sich in Tabelle 15 im Anhang. Die verwendeten Fragmente der Haushaltsgene wurden ausgehend von mRNA aus Plazenta amplifiziert und in den Vektor pCRII TOPO kloniert. Durch eine Restriktions-spaltung mit EcoR I und Sequenzierung wurden diese Klone überprüft. Alle klonierten Haushaltsgene wurden nach Transfektion in *E. coli* JM101 vermehrt und mittels Plasmid-präparation aufgereinigt. Anschließend wurden die klonierten Fragmente als Grundlage für die PCR verwendet. Alle synthetisierten PCR-Produkte wurden elektrophoretisch überprüft (Abb. 8). Die ausgewählten PCR-Produkte wurden nach ihrer Synthese aufgereinigt und in einer Konzentration von 100 ng/ μ l in den cDNA-Dot-Blot eingesetzt.

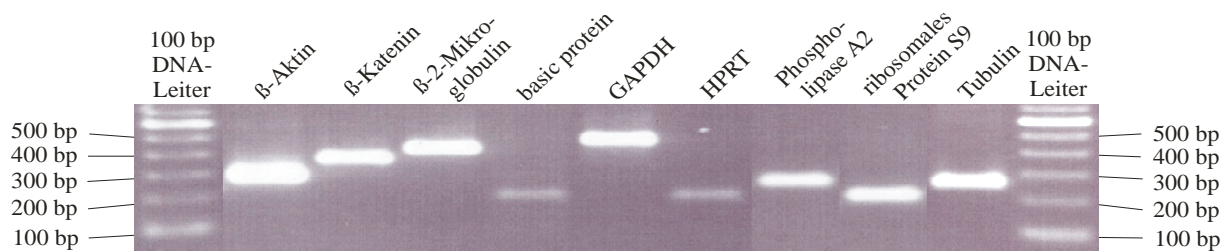


Abbildung 8: Elektrophoretische Auftrennung der spezifischen PCR-Produkte für die Haushaltsgene.

3.1.2 Bereitstellung der RNA aus Biopsiematerial

Das Ausgangsmaterial für die Validierung der Expression potentieller Tumorsuppressor- und Onkogene stellt RNA, isoliert aus Biopsiematerial von Tumoren und Normalgeweben der Mamma, dar. Sie wurde nach reverser Transkription als Hybridisierungs-sonde für die cDNA-Dot-Blots und als Grundlage für die Echtzeit-PCR eingesetzt. Ausgewählt wurden Biopsien mit einem möglichst hohen Anteil an Tumor- bzw. gesundem Drüsengewebe (Abb. 10). Für die RNA-Extraktion wurden 20 Gewebeschnitte mit einer Stärke von 10 μ m angefertigt. Parallel dazu wurden Gewebeschnitte mit einer Stärke von 5 μ m zur Klassifizierung der Proben durch einen Pathologen angefertigt. Für die durchgeführten Experimente wurden nur die Tumorbipsien verwendet, die histopathologisch bestätigt werden konnten und die Normalgewebe, welche ausschließlich gesundes Drüsengewebe enthielten (Tabellen 19 und

20 im Anhang). Die aus den Gewebeschnitten isolierte Gesamt-RNA wurde elektrophoretisch auf ihre Güte überprüft und gleichzeitig wurde eine Konzentrationsbestimmung durchgeführt (Abb. 9). Von den vier verwendeten Normalgeweben wurde anschließend ein Pool durch Mischen von je 1 µg RNA angefertigt. In die folgende reverse Transkription wurde jeweils 1 µg Gesamt-RNA eingesetzt. Die mit Hilfe der Oligo-dT-Primer synthetisierte cDNA repräsentiert die in der Gesamt-RNA enthaltene mRNA.

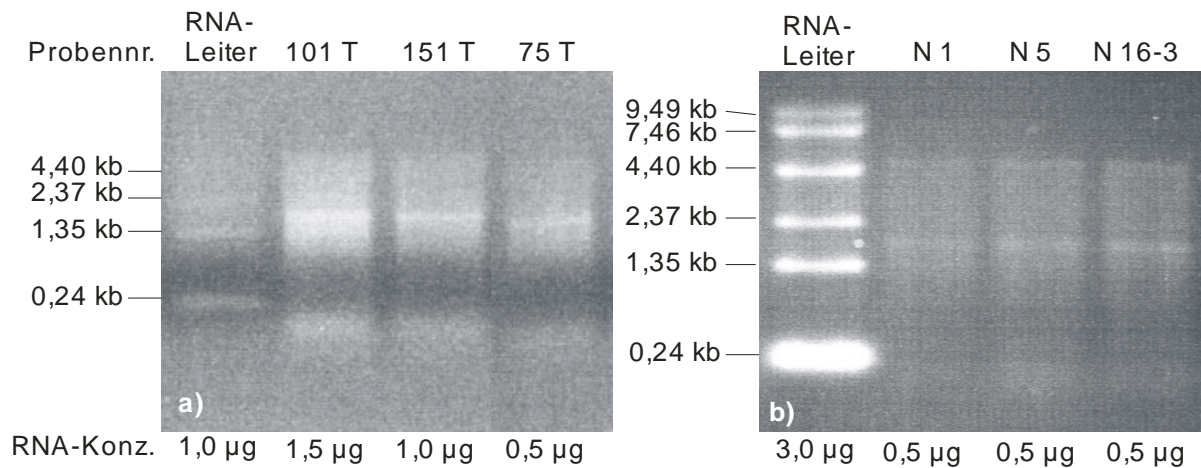


Abbildung 9: Beispiele für aufgereinigte RNA aus Biopsiematerial von a) Tumoren und b) Normalgeweben der Mamma. Es wurden jeweils 2 µl der isolierten RNA in einem 1%igen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Unter der Abbildung sind die geschätzten RNA-Konzentrationen angegeben.

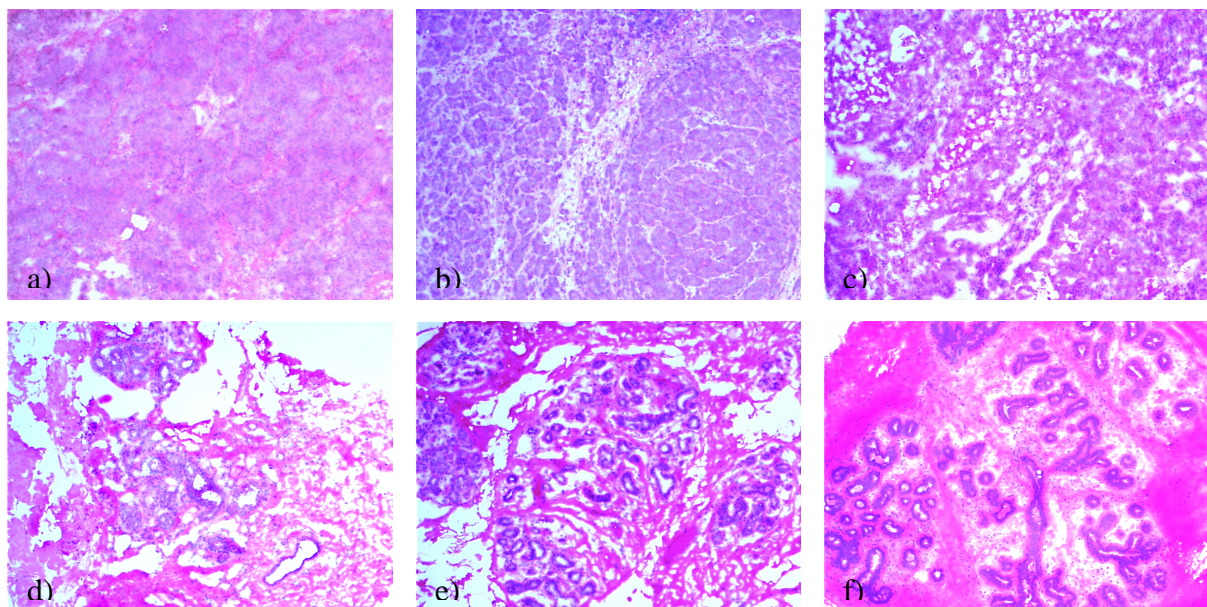


Abbildung 10: Gewebeschnitte von Tumoren und Normalgeweben der Mamma. Mikrofotographie nach HE-Färbung, Vergrößerung 10x. a) 75 T: invasiv duktales Karzinom, Grad 2, TNM pT4bC4 pN1biiiC4 M0C2, b) 101T: invasiv duktales Karzinom, Grad 2, TNM pT1cC4 pN1biiC4 M0C1, c) 151T: invasiv duktales Karzinom, Grad 3, TNM pT2(m)C4 pN3C4 M0C2) d) N1, e) N5, f) N16-3), Anhand dieser Gewebeschnitte wurden die Patientenproben klassifiziert. Dargestellt sind hier die zu den in Abbildung 9 gezeigten RNA-Isolierungen gehörigen Gewebeschnitte.

3.1.3 Untersuchung der Transkription mittels cDNA-Dot-Blot

In dieser Arbeit wurde die Konzentration der mRNA von 20 im Mammakarzinom möglicherweise differentiell transkribierten Genen und neun Haushaltsgenen anhand von spezifischen PCR-Produkten an bis zu 19 dukalen Mammakarzinomen und vier Mammanormalgeweben mittels cDNA-Dot-Blot untersucht. Hierzu wurden die PCR-Produkte im Überschuss kovalent an eine positiv geladene Nylonmembran gebunden und mit revers transkribierter und radioaktiv markierter mRNA hybridisiert. Die radioaktiv markierte mRNA stammt aus den zu untersuchenden Geweben (Tabellen 19 und 20 im Anhang). Die Intensität der Hybridisierung wird als Grad der Schwärzung (PSL) gemessen. Sie korreliert direkt mit der Menge der für das entsprechende Gen vorhandenen mRNA. Nach einem Vergleich der Hybridisierungsintensitäten zwischen Tumor- und Normalgewebeproben lässt sich auf eine stärkere beziehungsweise schwächere Transkription des Gens in einem der Gewebe schließen.

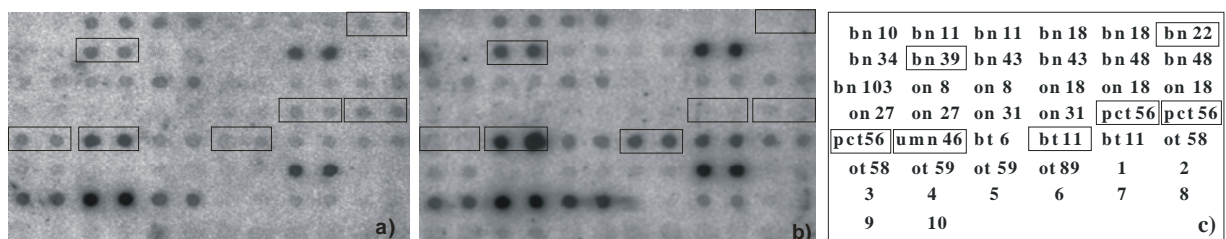


Abbildung 11: Hybridisierung von cDNA-Dot-Blots. Hybridisierung mit revers transkribierter RNA (cDNA's doppelt gespottet) aus a) Normal- und b) Tumorgewebe (invasiv duktales Karzinom) der Mamma, c) Probenbeschriftung 1-10 Haushaltsgene: 1) β -Aktin, 2) β -Katenin, 3) β -2-Mikroglobulin, 4) *basic protein*, 5) GAPDH, 6) HPRT, 7) Keratin 8, 8) Phospholipase A2, 9) ribosomales Protein, 10) Tubulin; die Umrisse markieren im Tumorgewebe regulierte Gene: bn 22: herunter reguliert, bn 39: herauf reguliert, pct 56: herunter reguliert, umn 46: herauf reguliert, bt 11: herauf reguliert.

Die hybridisierten cDNA-Dot-Blots wurden zur computergestützten Auswertung mit Bio-Imager-Platten exponiert und am Phosphorimager eingelesen. Bei der Auswertung mit dem Programm AIDA Ver 3.00 wurde zur Berechnung der Transkriptionsunterschiede der Grad der Schwärzung herangezogen. Dabei erfolgte ein automatischer Abzug von Hintergrundsignalen mit der Methode des „local dot ring“. Das bedeutet, um jedes zu analysierende Hybridisierungssignal wird die Hintergrundschwärzung in einem bestimmten Radius gemessen und für dieses Signal abgezogen. Als Vergleichswerte zur Berechnung von Transkriptionsunterschieden wurden die Messwerte des mit cDNA aus einem RNA-Gemisch der vier Normalgewebe hybridisierten cDNA-Dot-Blots als „normal“ herangezogen.

Bevor die ermittelten Schwärzungsgrade zwischen den Tumor- und Normalgewebeproben auf ihre Transkriptionsstärke verglichen werden konnten, mussten die Daten mit Hilfe der Werte der neun Haushaltsgene normalisiert werden. Differenzen in der cDNA-Konzentration der

Haushaltsgene zwischen den untersuchten Proben werden durch den Prozess der Probenbearbeitung verursacht. Durch die Normalisierung wurden diese Differenzen rechnerisch entfernt. Mit Hilfe der Software geNORM V3.3 wurden die am stabilsten transkribierten (Genexpressionsstabilität $M < 1,5$) der verwendeten Haushaltsgene bestimmt. Die Genexpressionsstabilität wird basierend auf dem geometrischen Mittel aller untersuchten Gewebeproben berechnet. Mit den Haushaltsgenen β -Aktin ($M = 1,194$), β -Katenin ($M = 1,050$) und HPRT ($M = 0,814$) wurde der Normalisierungsfaktor für die Genexpression ermittelt. Zur Normalisierung der Rohdaten wurde der Quotient aus angegebenem Schwärzungsgrad und Normalisierungsfaktor für jedes Hybridisierungssignal berechnet. Das Transkriptionsverhältnis Tumor/Normal wurde durch Division des normalisierten Wertes des Tumors durch den normalisierten Wert des RNA-Gemischs der Normalgewebe gebildet. Der Transkriptionsunterschied wurde als signifikant angesehen, wenn das Verhältnis Tumor/Normal kleiner 0,5 bzw. größer 2 war ($0,5 < x < 2$). Unter einem Faktor von 0,5 wird von einer Herunterregulation und über einem Faktor von 2 wird von einer Heraufregulation der Transkription des Gens gesprochen.

Von den 20 untersuchten Genen wurden sieben in ihrem theoretisch ermittelten Transkriptionsunterschied zwischen Tumor- und Normalgewebe bestätigt (siehe Tabelle 1 und 2) (Transkriptionsverhältnis aller Gene siehe Tab. 24-26 im Anhang). Das sind ausschließlich Gene, die in der Mehrzahl der Tumore herunter reguliert waren. Davon sind drei der Gene, bn 22, bn 39 und pct 56, in mehr als 75 % der untersuchten Tumoren herunter reguliert. Die Stärke der Regulation in den einzelnen Tumoren ist unterschiedlich ausgeprägt. Die potentiellen Tumorsuppressorgene bn 39 und pct 56 sind in den Tumoren sehr stark herunter reguliert, alle anderen dagegen nur schwach. Es wurden keine in der Mehrzahl der Tumoren herauf regulierten Gene gefunden. Nur die beiden potentiellen Onkogene bt 6 und bt 11 wiesen in einem Teil der Tumore eine erhöhte Expression auf. Die Tumorsuppressorgene bn 22, bn 39 und pct 56 wurden nach diesem Quantifizierungsexperiment für weitere Untersuchungen als am interessantesten bewertet, da sie in fast allen Tumoren herunter reguliert waren.

Tabelle 1: Zusammenfassung der mittels cDNA-Dot-Blot ermittelten Expressionsdaten für die untersuchten Tumorsuppressorgene.

Gen-ID	Herunterregulation	keine Regulation	Heraufregulation	Stärke der Regulation	
				2x	8x
bn 10	6/21 (28,6 %)	11/21 (52,4 %)	4/21 (19,0 %)	4/6 (66,7 %)	2/6 (33,3 %)
bn 11	10/21 (47,6 %)	10/21 (47,6 %)	1/21 (4,8 %)	9/10 (90,0 %)	1/10 (10,0 %)
bn 18	14/20 (70,0 %)	6/20 (30,0 %)	0/20 (0,0 %)	12/14 (85,7 %)	2/14 (14,3 %)
bn 22	17/19 (89,5 %)	2/19 (10,5 %)	0/19 (0,0 %)	11/17 (64,7 %)	6/17 (35,3 %)

Gen-ID	Herunter-regulation	keine Regulation	Herauf-regulation	Stärke der Regulation	
				2x	8x
bn 34	6/19 (31,6 %)	11/19 (57,9 %)	2/19 (10,5 %)	6/6 (100,0 %)	0/6 (0,0 %)
bn 39	20/21 (95,2 %)	1/21 (4,8 %)	0/21 (0,0 %)	6/20 (30,0 %)	<u>14/20 (70,0 %)</u>
bn 43	7/19 (36,8 %)	12/19 (63,2 %)	0/19 (0,0 %)	7/7 (100,0 %)	0/7 (0,0 %)
bn 48	6/20 (30,0 %)	10/20 (50,0 %)	4/20 (20,0 %)	5/6 (83,3 %)	1/6 (16,7 %)
bn 103	14/21 (66,7 %)	7/21 (33,3 %)	0/21 (0,0 %)	13/14 (92,9 %)	1/14 (7,1 %)
on 8	6/21 (28,6 %)	13/21 (61,9 %)	2/21 (9,5 %)	5/6 (83,3 %)	1/6 (16,7 %)
on 18	8/21 (38,1 %)	11/21 (52,4 %)	2/21 (9,5 %)	7/8 (87,5 %)	1/8 (12,5 %)
on 27	11/21 (52,4 %)	10/21 (47,6 %)	0/21 (0,0 %)	8/11 (72,7 %)	3/11 (27,3 %)
on 31	12/21 (57,1 %)	9/21 (42,9 %)	0/21 (0,0 %)	10/12 (83,3 %)	2/12 (16,7 %)
pct 56	18/20 (90,0 %)	2/20 (10,0 %)	0/20 (0,0 %)	5/18 (27,8 %)	<u>13/18 (72,2 %)</u>
umn 46	7/20 (35,0 %)	10/20 (50,0 %)	3/20 (15,0 %)	3/7 (42,9 %)	4/7 (57,1 %)

Dargestellt ist für jedes untersuchte Gen die Anzahl (Prozent) der Tumore, bei denen eine veränderte Genexpression gegenüber dem RNA-Gemisch der Normalgewebe gefunden wurde. Fett hervorgehoben sind die Gene, die in über 50 % der Tumoren herunter reguliert waren. Außerdem wurde die Stärke der Herunterregulation dargestellt. Dabei sind die Gene, bei denen ein Großteil der Tumore (über 50 %) eine über 8x geringere Expression als das RNA-Gemisch der Normalgewebe aufwies, unterstrichen hervorgehoben.

Tabelle 2: Zusammenfassung der mittels cDNA-Dot-Blot ermittelten Expressionsdaten für die untersuchten Onkogene.

Gen-ID	Herunter-regulation	keine Regulation	Herauf-regulation	Stärke der Regulation	
				2x	8x
bt 6	1/21 (4,8 %)	16/21 (76,2 %)	4/21 (19,0 %)	4/4 (100,0 %)	0/4 (0,0 %)
bt 11	1/21 (4,8 %)	16/21 (76,2 %)	4/21 (19,0 %)	4/4 (100,0 %)	0/4 (0,0 %)
ot 58	4/21 (19,0 %)	12/20 (57,1 %)	5/21 (23,9 %)	3/5 (60,0 %)	2/5 (40,0 %)
ot 59	6/21 (28,6 %)	15/21 (71,4 %)	0/21 (0,0 %)	0/0 (0,0 %)	0/0 (0,0 %)
ot 89	6/19 (31,6 %)	13/19 (68,4 %)	0/19 (0,0 %)	0/0 (0,0 %)	0/0 (0,0 %)

Dargestellt ist für jedes untersuchte Gen die Anzahl (Prozent) der Tumore, bei denen eine veränderte Genexpression gegenüber dem RNA-Gemisch der Normalgewebe gefunden wurde.

3.1.4 Untersuchung der Transkription mittels Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion

Außer den Expressionsanalysen mittels cDNA-Dot-Blot wurde die mRNA-Konzentration der 20 Kandidatengene und neun Haushaltsgene an den bereits verwendeten 19 dukталen Mammakarzinomen und vier Mamma Normalgeweben mittels Echtzeit-PCR untersucht. Mit dieser Methode kann die Konzentration eines PCR-Produktes während der Amplifikation mit Hilfe von Fluoreszenzfarbstoffen direkt vermessen werden. Bei den durchgeführten Experimenten wurde als Fluoreszenzfarbstoff *SYBR Green I* eingesetzt. Dieser Farbstoff bindet nichtsequenzspezifisch in die kleine Furche doppelsträngiger DNA.

Zur Berechnung der Transkriptionsstärke der untersuchten Gene wurde die Methode der relativen Quantifizierung verwendet. Sie basiert auf der Berechnung einer definierten Standardkurve anhand bekannter Mengen in die PCR eingesetzter Plasmid-DNA oder cDNA.

Mit Hilfe dieser Standardkurve können unbekannte Konzentrationen an cDNA berechnet werden. Während der exponentiellen Phase einer PCR korreliert die signifikante Zunahme an PCR-Produkt mit der initial eingesetzten Menge an cDNA, abhängig von der Effizienz der Reaktion. Das gemessene Fluoreszenzsignal verstärkt sich direkt proportional zur Menge an PCR-Produkt. Zur Berechnung der Konzentration der zu untersuchenden cDNA-Proben wurde innerhalb der exponentiellen Phase der PCR ein Schwellenwert (*Threshold* = Wert mit der optimalen Schätzung der Konzentration der Standards) festgelegt und die Standardkurve ermittelt. Mit Hilfe des Schwellenwertes konnten die „Ct-Werte“ (Amplifikationskurven schneiden den Schwellenwert) und die Konzentration der untersuchten cDNA-Proben berechnet werden. Für die Auswertung der Echtzeit-PCR wurden zwei automatische Normalisierungsmethoden verwendet, um gemessene Hintergrundfluoreszenzen auszuschließen. Zum einen die Methode der „*Dynamic tube normalisation*“, zum anderen wurde eine „*Noise Slope Correction*“ durchgeführt. Die mit den korrigierten Werten ermittelte cDNA-Konzentration sollte der Konzentration der in der reversen Transkription eingesetzten mRNA entsprechen, da die reverse Transkription eine lineare Amplifikationsmethode darstellt.

Die Bestätigung der Spezifität der verwendeten PCR-Produkte wurde anhand der erhaltenen Daten über die Güte der PCR aus Reaktionseffizienz, Schmelzkurven und der Banden der PCR-Produkte im Agarosegel getroffen. Die mittlere Reaktionseffizienz in den vorliegenden Experimenten lag bei 0,93 (STABW $\pm 0,12$). In den Schmelzkurven war nur ein Schmelzpunkt, ein spezifisches PCR-Produkt repräsentierend, erkennbar. Das PCR-Produkt wurde durch gelelektrophoretische Auftrennung nochmals überprüft.

Bevor die berechneten Konzentrationen zwischen Tumor- und Normalgewebeproben verglichen werden konnten, mussten die Daten mit Hilfe der ermittelten Konzentrationen für die Haushaltsgene normalisiert werden. Damit wurden durch die Probenbearbeitung verursachte Fehler rechnerisch entfernt. Mit Hilfe der Software geNORM V3.3 wurden die am stabilsten transkribierten Haushaltsgene (Genexpressionsstabilität $M < 1,5$) bestimmt und zur Berechnung des Normalisierungsfaktors für die Genexpression in jeder Gewebeprobe herangezogen. Als am stabilsten transkribierte Gene wurden β -Aktin ($M=1,422$), β -Katenin ($M=1,295$) und Phospholipase A2 ($M=1,531$) ermittelt. Die Berechnung des Expressionsverhältnisses Tumor/Normal erfolgte analog zur Berechnung für die cDNA-Dot-Blots (siehe 3.1.3). Von den 20 untersuchten Genen wurde bei sieben Genen ein Transkriptionsunterschied zwischen Tumor- und Normalgewebe in über der Hälfte der untersuchten Proben gefunden (siehe Tabellen 3 und 4) (Transkriptionsverhältnis aller Gene siehe Tab. 21-23 im Anhang).

Fünf der Gene waren in der Mehrzahl der Tumore herunter reguliert. Außerdem wurden zwei in der Mehrzahl der Tumore herauf regulierte Gene gefunden. Die Stärke der Regulation in den einzelnen Tumoren ist unterschiedlich ausgeprägt. Die potentiellen Tumorsuppressorgene bn 22 und bn 39 sind in der Mehrzahl der Tumore sehr stark herunter reguliert, alle anderen dagegen nur schwach. Bei den Onkogenen bt 11 und ot 59 weisen die Tumore nur eine schwach erhöhte Expression auf. Die Tumorsuppressorgene bn 22, bn 39 und pct 56 wurden nach diesem zweiten Quantifizierungsexperiment für weitere Untersuchungen als am interessantesten bewertet, da sie in fast allen Tumoren herunter reguliert waren. Von den potentiellen Onkogenen wurden bt 11 und ot 59 aufgrund ihrer erhöhten Transkription in vielen Tumoren in die folgenden Analysen als Kandidatengene aufgenommen. Das potentielle Onkogen ot 89 wird ebenfalls weiter untersucht, da seine Expression in einigen Proben sehr stark reguliert war.

Tabelle 3: Zusammenfassung der mittels Echtzeit-PCR ermittelten Expressionsdaten für die untersuchten Tumorsuppressorgene.

Gen-ID	Herunter-regulation	keine Regulation	Heraufregulation	Stärke der Regulation	
				2x	8x
bn 10	0/10 (0,0 %)	8/10 (80,0 %)	2/10 (20,0 %)	0/0 (0,0 %)	0/0 (0,0 %)
bn 11	2/18 (11,1 %)	4/18 (22,2 %)	12/18 (66,6 %)	9/10 (90,0 %)	1/10 (10,0 %)
bn 18	3/10 (30,0 %)	7/10 (70,0 %)	0/10 (0,0 %)	0/3 (0,0 %)	3/3 (100,0 %)
bn 22	9/10 (90,0 %)	1/10 (10,0 %)	0/10 (0,0 %)	5/10 (50,0 %)	<u>5/10 (50,0 %)</u>
bn 34	2/19 (10,5 %)	12/19 (63,2 %)	5/19 (26,3 %)	2/2 (100,0 %)	0/2 (0,0 %)
bn 39	7/8 (87,5 %)	0/8 (0,0 %)	1/8 (12,5 %)	3/7 (42,9 %)	<u>4/7 (57,1 %)</u>
bn 43	1/10 (10,0 %)	7/10 (70,0 %)	2/10 (20,0 %)	2/2 (100,0 %)	0/2 (0,0 %)
bn 48	15/19 (78,9 %)	3/19 (15,8 %)	1/19 (5,3 %)	12/15 (80,0%)	3/15 (20,0 %)
bn 103	2/8 (25,0%)	5/8 (62,5 %)	1/8 (12,5 %)	1/2 (50,0 %)	1/2 (50,0 %)
on 27	15/19 (78,9 %)	3/19 (15,8 %)	1/19 (5,3 %)	14/15 (93,3 %)	1/15 (6,7 %)
on 31	5/19 (26,3 %)	12/19 (63,2 %)	2/19 (10,5 %)	5/5 (100,0 %)	0/5 (0,0 %)
pct 56	13/19 (68,4 %)	4/19 (21,1 %)	2/19 (10,5 %)	9/13 (69,2%)	4/13 (30,8 %)
umn 46	0/10 (0,0 %)	0/10 (0,0 %)	10/10 (100,0 %)	0/0 (0,0 %)	0/0 (0,0 %)

Dargestellt ist für jedes untersuchte Gen die Anzahl (Prozent) der Tumore, bei denen eine veränderte Genexpression gegenüber dem RNA-Gemisch der Normalgewebe gefunden wurde. Fett hervorgehoben sind die Gene, die in über 50 % der Tumoren herunter reguliert waren.

Tabelle 4: Zusammenfassung der mittels Echtzeit-PCR ermittelten Expressionsdaten für die untersuchten Onkogene.

Gen-ID	Herunter-regulation	keine Regulation	Heraufregulation	Stärke der Regulation	
				2x	8x
bt 6	2/18 (11,1 %)	11/18 (61,1 %)	5/18 (27,8 %)	5/5 (100,0 %)	0/5 (0,0 %)
bt 11	0/8 (0,0 %)	0/8 (0,0 %)	8/8 (100,0%)	7/8 (87,5 %)	1/8 (12,5 %)
ot 58	4/19 (21,1 %)	8/19 (42,1%)	7/19 (36,8 %)	7/7 (100,0 %)	0/7 (0,0 %)
ot 59	0/8 (0,0 %)	2/8 (25,0 %)	6/8 (75,0 %)	5/6 (83,3 %)	1/6 (16,7 %)
ot 89	5/19 (26,3 %)	8/19 (42,1%)	6/19 (31,6 %)	5/6 (83,3 %)	1/6 (16,7 %)

Dargestellt ist für jedes untersuchte Gen die Anzahl (Prozent) der Tumore, bei denen eine veränderte Genexpression gegenüber dem RNA-Gemisch der Normalgewebe gefunden wurde. Fett hervorgehoben sind die Gene die in der Mehrzahl der Tumoren herauf reguliert waren.

3.1.5 Zusammenfassung der Ergebnisse aus cDNA-Dot-Blot und Echtzeit-PCR

Anhand der zur Verifizierung der theoretischen Datenbankanalysen gesammelten experimentellen Daten liess sich eine Bestätigung der Vorhersage in vielen Fällen zeigen. Mit den beiden hier verwendeten Validierungsmethoden liessen sich ein Drittel der als theoretisch differentiell transkribiert gefundenen Gene in ihrer Expression bestätigen (siehe Tabelle 5). Mittels cDNA-Dot-Blot wurden für die Mehrzahl der untersuchten potentiellen Tumorsuppressorgene die theoretisch erstellten Expressionsdaten bestätigt. Mit Hilfe der Echtzeit-PCR wurde eine höhere Anzahl an Genen mit veränderter Expression im Verhältnis zum Normalgewebe als mit der Methode der cDNA-Dot-Blots nachgewiesen. Außerdem war es mit dieser Methode möglich, die herauf regulierte Expression von potentiellen Onkogenen im Tumorgewebe zu bestätigen. Alle Messwerte sind im Einzelnen im Anhang, in den Tabellen 21 und 22 nachzulesen.

Tabelle 5: Zusammenfassung der Daten zur experimentell ermittelten Expression der sechs ausgewählten Kandidatengene in Mammakarzinomen.

Gen-ID	bn 22	bn 39	pct 56	bt 11	ot 59	ot 89
erwartete Regulation nach „ <i>in silico</i> “-Analyse	↓	↓	↓	↑	↑	↑
Ergebnis cDNA-Dot-Blot	17/19 ↓ 89 %	20/21 ↓ 95 %	18/20 ↓ 90 %	4/21 ↑ 19 %	1/21 ↑ 5 %	0/19 ↑ 0 %
Ergebnis Echtzeit-PCR	9/10 ↓ 90 %	7/8 ↓ 88 %	13/19 ↓ 68 %	8/8 ↑ 100 %	6/8 ↑ 75 %	6/19 ↑ 32 %
experimentell ermittelte Regulation	↓	↓	↓	↑	↑	↓↑

In den Zeilen „Ergebnis cDNA-Dot-Blot“ und „Ergebnis Echtzeit-PCR“ ist die Anzahl der Tumore, in denen eine differentielle Transkription entsprechend der Erwartungen nach den „*in silico*“-Analysen gefunden wurde, dargestellt. (↓ = herunter reguliert, ↑ = herauf reguliert, ↓↑ = keine eindeutige Regulation)

3.2 Klonierung der sechs ausgewählten differentiell exprimierten Gene

Für alle folgenden detaillierten Analysen zu den sechs interessantesten Kandidatengenen sollte der komplette offene Leserahmen dieser Gene, kloniert in verschiedene Expressionsvektoren, zur Verfügung stehen. Diese Klone sollten als Hybridisierungssonden in den RNA-RNA-*in situ*-Hybridisierungen und Northern-Blot-Analysen, sowie zur Proteinexpression in prokaryontischen Expressionssystemen verwendet werden. Des Weiteren sollten sie in funktionellen Studien in Zellkultursystemen eingesetzt werden.

3.2.1 Datenbankrecherchen

Zur Vervollständigung des gesamten offenen Leserahmens der reguliert exprimierten Gene ITIH5 (bn 22), Alpha-B-Crystallin (bn 39), PIGR (pct 56), capG (bt 11), 14-3-3 zeta (ot 59) und FABP5 (ot 89) wurden zunächst umfassende Homologieuntersuchungen der vorhandenen cDNA-Klone mit den Datenbankeinträgen des NCBI durchgeführt. Verwendet wurde hierfür die Software BLAST. Anhand der resultierenden homologen Datenbankeinträge zur vollständigen mRNA der sechs Gene war es möglich, die kompletten offenen Leserahmen zu bestimmen. Kloniert wurde die cDNA vom ersten Methionin bis zum Stopcodon entsprechend der Datenbankeinträge. Anhand umfangreicher Literaturrecherchen konnten die Eigenschaften der Gene, mRNAs und Proteine ermittelt werden. Wichtig für die anschließenden Arbeiten war außerdem die Kenntnis möglicher Funktionen der einzelnen Genprodukte in der Zelle. Die Eigenschaften der Gene, mRNA und Proteine sowie die Funktionen der identifizierten Proteine werden in der Diskussion ausführlich besprochen. Die zusammengefassten Ergebnisse der Datenbankrecherchen sind in Tabelle 6 dargestellt.

3.2.2 Amplifikation, Klonierung und Sequenzierung der sechs Kandidatengene

Als Grundlage für die Klonierung der offenen Leserahmen wurde mRNA aus Biopsien von gesundem Mammagewebe verwendet. In einer reversen Transkription wurde die isolierte RNA in cDNA umgeschrieben. Diese diente als Ausgangsmaterial für anschließende PCR-Reaktionen. In den durchgeführten PCR-Amplifikationen wurde die Platinum® Pfx DNA Polymerase verwendet. Dieses Enzym sollte durch seine *proof reading*-Aktivität die fehlerfreie Generierung von PCR-Produkten ermöglichen. In die für die Klonierung verwendeten PCR-Primer wurden Schnittstellen für Restriktionsendonukleasen eingebracht. Sie garantieren nach der PCR eine gerichtete Klonierung in verschiedene Vektoren. Es wurden für die folgenden Experimente die Expressionsvektoren pBK-CMV, pBK-CMV Δ und pET29a ausgewählt. In den Tabellen 16 und 17 im Anhang sind die für die Klonierungen verwendeten PCR-Primer zusammengefasst dargestellt. Die jeweiligen Konstrukte wurden durch Transformation in *E. coli* JM109 vermehrt und mittels Plasmidpräparation aufgereinigt. Zur Kontrolle der Größe der klonierten cDNAs wurden diese durch Restriktionsspaltung aus dem Expressionsvektor isoliert und elektrophoretisch aufgetrennt (Abb. 12). Es wurden Sequenzierungen aller Klone durchgeführt und die Sequenz sowie der korrekte Leserahmen mit den Programmen BLAST und ORF Finder (NCBI) überprüft.

Gen-ID	bn 22	bn 39	pct 56	bt 11	ot 59	ot 89
Zugriffsnummer	AY238437	NM_001885	NM_002644	NM_001747	NM_003406	NM_001444
Bezeichnung	inter-alpha trypsin inhibitor heavy chain precursor 5 (ITIH5)	Alpha-B-Crystallin	polymeric immunoglobulin receptor (PIGR)	capping protein, gelsolin-like (CapG)	tyrosine 3-mono-oxygenase / tryptophan 5-monooxygenase activation protein, zeta polypeptide (YWHAZ)	fatty acid binding protein 5 (FABP5)
chrom. Lokalisation	10p15	11q22.3-q23.1	1q31-q41	2cen-q24	8q23.1	8q21.13
Länge des Gens	103,8 kb	3,1 kb	17,9 kb	15,6 kb	34,6 kb	4,2 kb
Anzahl der Exons	14	3	11	10	6	4
Größe der mRNA	2871 bp	691 bp	4266 bp	1221 bp	2834 bp	662 bp
Länge des ORF	2829 bp	528 bp	2295 bp	1047 bp	738 bp	408 bp
Größe des Proteins	942 as	175 as	764 as	348 as	245 as	135 as
Domänen	„vault protein inter-alpha-trypsin“-Domäne, „vonWillebrand factor type A“-Domäne	HSP20-Domäne, Alpha-Crystallin-Domäne	5 Immunglobulin-domänen, Transmembran-domäne, zytoplasmatische Domäne	3 Kalzium- und Aktinbindende Gelsolin-Homologie-Domänen	14-3-3-Domäne	Lipocalin-Domäne
Lage in der Zelle	extrazelluläre Matrix	Zytoplasma	Transzytose-apparat	Zytoplasma	Zytoplasma	Zytoplasma
bekannte Funktion	Vernetzung von Hyaluronsäure in der ECM	Hitzeschock-protein, Chaperon	dIgA-Transporter	Stabilisierung von Aktinfilamenten	räumliche Organisation von Signalkomplexen	Transport von Fettsäuren

Tabelle 6: Zusammenfassung der bekannten Daten zu den 6 ausgewählten Kandidatengen.

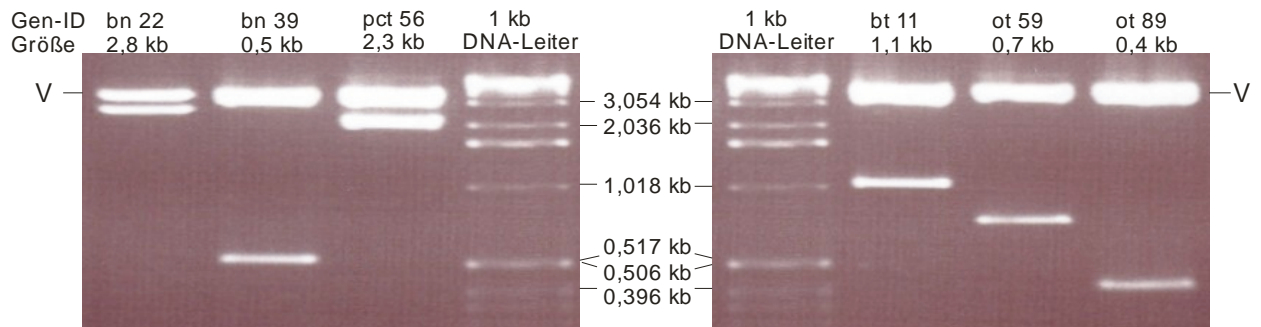


Abbildung 12: Elektrophoretische Auftrennung der Restriktionsspaltung aller sechs Kandidatengene aus dem Expressionsvektor pBK-CMVΔ (V).

3.3 Untersuchung der Transkriptionsunterschiede der sechs ausgewählten Kandidatengene auf RNA-Ebene

3.3.1 RNA-RNA-*in situ*-Hybridisierung

Mittels der RNA-RNA-*in situ*-Hybridisierung besteht die Möglichkeit, die Transkription spezifischer mRNA zwischen Tumorgewebe und Normalgewebe direkt zu vergleichen. Damit können die mit den cDNA-Dot-Blots und Echtzeit-PCRs erhaltenen Daten nochmals bestätigt werden. Außerdem lassen sich die mRNA-Transkripte in speziellen Zellen im Gewebeverband lokalisieren.

Um die differentielle Expression der sechs ausgewählten Kandidatengene direkt am Gewebe zu überprüfen, wurden RNA-RNA-*in situ*-Hybridisierungen an jeweils 20 duktalem Karzinomen der Mamma und 20 Normalgeweben der Mamma durchgeführt (siehe Tabelle 19, 20). Alle Gewebeschnitte wurden histopathologisch überprüft. Die Auswertung dieser Experimente erfolgte mikroskopisch. Die Signalintensität in den jeweiligen Schnitten wurde individuell eingeschätzt. Bei den RNA-RNA-*in situ*-Hybridisierungen wurden zur Erhöhung der Sensitivität der Hybridisierung die klonierten offenen Leserahmen der sechs Kandidatengene eingesetzt. Die Hybridisierung der Gewebeschnitte erfolgte nach Optimierungsexperimenten mit einer für jede Hybridisierungssonde spezifischen Temperatur. Sie wurde abhängig vom GC-Gehalt der Sonde gewählt. Zur Kontrolle der Spezifität der durchgeführten Experimente wurde mit *sense*- und *antisense*-Proben hybridisiert. Das Hybridisierungsmuster mit den *sense*-Proben war bei allen ausgewerteten Hybridisierungen schwach und gleichmäßig über den Schnitt verteilt. Die Ergebnisse der RNA-RNA-*in situ*-Hybridisierung mit den *antisense*-Proben sind in Tabelle 7 zusammengefasst dargestellt.

Tabelle 7: Zusammenfassende Auswertung der RNA-RNA-*in situ*-Hybridisierung für alle sechs Kandidatengene.

Signal- intensität	ITIH5 (bn 22)↓		Alpha-B-Crystallin (bn 39)↓		PIGR (pct 56)↓		capG (bt 11)↑		14-3-3 ζ (ot 59)↑		FABP5 (ot 89)↓↑	
	T	N	T	N	T	N	T	N	T	N	T	N
+++	/	/	1	2	1	2	1	/	14	/	/	/
++	/	3	3	8	5	8	4	/	3	8	/	/
+	/	14	3	8	5	5	6	6	3	9	/	/
+/-	/	/	/	/	1	1	8	8	/	1	/	/
-	20	3	12	2	6	/	1	4	/	/	20	20
Σ	20	20	19	20	18	16	20	18	20	18	20	20

Dargestellt sind die untersuchten Gewebeproben (T = Mammakarzinom, N = Mamma Normalgewebe), nach der Stärke der Signalintensität geordnet.

Bei der RNA-RNA-*in situ*-Hybridisierung für den Volllängenklon von ITIH5 (bn 22) konnte die in cDNA-Dot-Blot und Echtzeit-PCR gefundene differentielle Expression des Gens bestätigt werden. In den analysierten Tumorgeweben war keine oder nur eine sehr schwache Expression zu erkennen. In den epithelialen Zellen des Normalgewebes (in 17 von 20 Fällen) wurde eine schwache, aber deutliche Expression nachgewiesen, die in den Lobuli und Dukti, aber nicht in Stromazellen detektierbar war.

Bei der RNA-RNA-*in situ*-Hybridisierung für α -B-Crystallin (bn 39) wurden die Ergebnisse der Quantifizierungsexperimente ebenfalls bestätigt. Hier zeigten die Tumore zum Großteil (12 von 19) ein negatives Hybridisierungsmuster. Einige Tumore (sechs von 19) reagierten dagegen über die gesamten Tumorinseln verteilt fokal positiv. Im Normalgewebe hybridisierte die Sonde in den Lobuli und Dukti gleichmäßig schwach bis mittel positiv (18 von 20). Bei zwei der Normalgewebeproben zeigte sich kein Hybridisierungssignal.

Bei der für PIGR (pct 56) durchgeführten RNA-RNA-*in situ*-Hybridisierung konnte die bei den Quantifizierungsexperimenten gefundene differentielle Expression des Gens bestätigt werden, obwohl die Tumore ein stark heterogenes Hybridisierungsmuster zeigten (Abbildung 13a-d). Sechs von 18 Tumorproben zeigten keine Hybridisierungssignale. Es wurden Tumore mit einem über den gesamten Tumor gleichmäßig starken Hybridisierungsmuster gefunden. In den übrigen 10 Fällen war das Hybridisierungsmuster im Gewebe sehr heterogen. Es fanden sich einige Regionen mit mittlerer bis stark positiver Reaktion innerhalb von nicht hybridisierendem Tumorgewebe. Meist befanden sich diese positiven Zellen um ein im Gewebsverband vorhandenes Lumen. Durchgängige Tumorinseln hybridisierten nicht oder nur sehr schwach an einzelnen Zellen. Alle 16 untersuchten Normalgewebeproben reagierten mit einer positiven Hybridisierung. Hier zeigten die um das Lumen der Lobuli und Dukti

angeordneten Drüsenzellen die stärkste Reaktion, wobei sich die Hybridisierung auf diese Zellschicht beschränkte. In fünf der hybridisierten Normalgewebe fand sich eine heterogene Hybridisierung, die an einigen Stellen sehr stark positiv ausfiel.

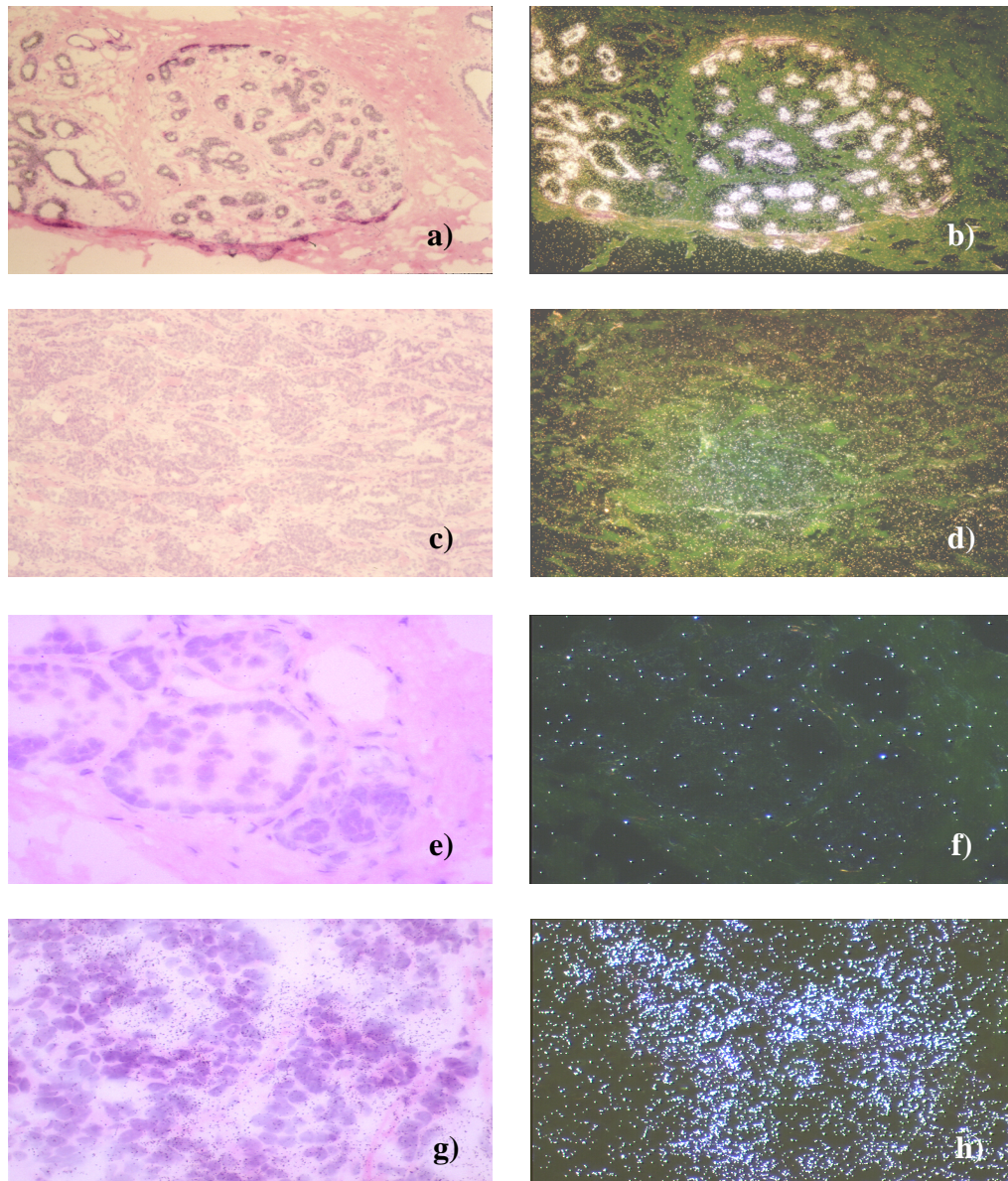


Abbildung 13: Beispiele für RNA-RNA-*in situ*-Hybridisierung mit einer spezifischen Sonde für pct 56 (a – d) und einer spezifischen Sonde für bt 11 (e – h). a) Hellfeldaufnahme und b) Dunkelfeldaufnahme eines Normalgewebes der Mamma (TB-Nr. 40N), c) Hellfeldaufnahme und d) Dunkelfeldaufnahme eines Tumors der Mamma (TB-Nr. 620T, invasiv duktales Karzinom Grad 2), e) Hellfeldaufnahme und f) Dunkelfeldaufnahme eines Normalgewebes der Mamma (TB-Nr. 3775N), g) Hellfeldaufnahme und h) Dunkelfeldaufnahme eines Tumors der Mamma (TB-Nr. 552T, invasiv duktales Karzinom Grad 3). Die Gewebeproben wurden nach der Hybridisierung einer HE-Färbung unterzogen. Vergrößerung 10x.

Die RNA-RNA-*in situ*-Hybridisierung für capG (bt 11) ergab im größten Teil der analysierten Gewebeproben keinen Unterschied zwischen Tumor- und Normalgewebe in der Stärke der Hybridisierung. Es wurden allerdings fünf Tumorgewebe mit mittlerer bis starker positiver Reaktion, jedoch kein so stark hybridisierendes Normalgewebe gefunden. Damit konnten die

Daten aus cDNA-Dot-Blot und Echtzeit-PCR für einen Teil der Tumore bestätigt werden (Abb. 13e-h). Die Mehrzahl der untersuchten Tumor- und Normalgewebeproben (14 von 20 Tumoren und 14 von 18 Normalgeweben) reagierte schwach positiv. Nur einer der Tumore reagierte negativ. Von 18 untersuchten Normalgewebeproben reagierten vier negativ. Bei einer der positiven Normalgewebeproben zeigte sich ein stärkeres, heterogen über den Schnitt verteiltes Hybridisierungssignal.

Die Analyse der RNA-RNA-*in situ*-Hybridisierung für 14-3-3 ζ (ot 59) ergab die Bestätigung der mit cDNA-Dot-Blot und Echtzeit-PCR ermittelten Expressionsdaten. Bei der Auswertung zeigten 14 der 20 untersuchten Tumore sehr starke Hybridisierungssignale, welche in drei Fällen heterogen über die Tumoreareale verteilt waren. Drei Tumore zeigten mittlere Expressionsstärken und drei weitere Tumore reagierten schwach positiv. Die 18 untersuchten Normalgewebeproben dagegen zeigten nur schwache bis mittlere Hybridisierungssignale.

Bei der RNA-RNA-*in situ*-Hybridisierung mit dem Volllängenklon für FABP5 (ot 89) war die Reaktion in den Tumor- und Normalgewebeproben bei sense- und antisense-Proben gleichmäßig schwach bis negativ, dieses Experiment war nicht auswertbar.

3.3.2 Northern-Blot-Analysen zur Expression der Kandidatengene in gesunden Geweben

Mit Hilfe von Northern Blot-Analysen lassen sich Informationen über die Größe der mRNA, alternative Spleißprodukte der Gene, die Expressionsstärke in verschiedenen Geweben und auch die Integrität der RNA gewinnen. In dieser Arbeit wurden Hybridisierungen kommerziell erhältlicher Normalgewebe-Northern-Blots durchgeführt. Verwendet wurden der „Northern TerritoryTM – Human Normal Tissue Blot I“, der „Hu Normal mRNA Blot IV“ und der „Human MTN Blot“. Die Daten zur Transkription in humanen Normalgeweben konnten jedoch nicht für alle Kandidatengene ermittelt werden, da die gleichen Blots mehrfach verwendet wurden. Hybridisiert wurden die Northern Blots mit den klonierten offenen Leserahmen für ITIH5 (bn 22), PIGR (pct 56) (teilweise), capG (bt 11) und FABP5 (ot 89). Anhand der Ergebnisse dieser Hybridisierungen konnte die theoretisch ermittelte Größe der mRNA bestätigt werden und es wurde ein guter Überblick über die Expression der Kandidatengene in gesunden Geweben erhalten (Abb. 14, Tabelle 8).

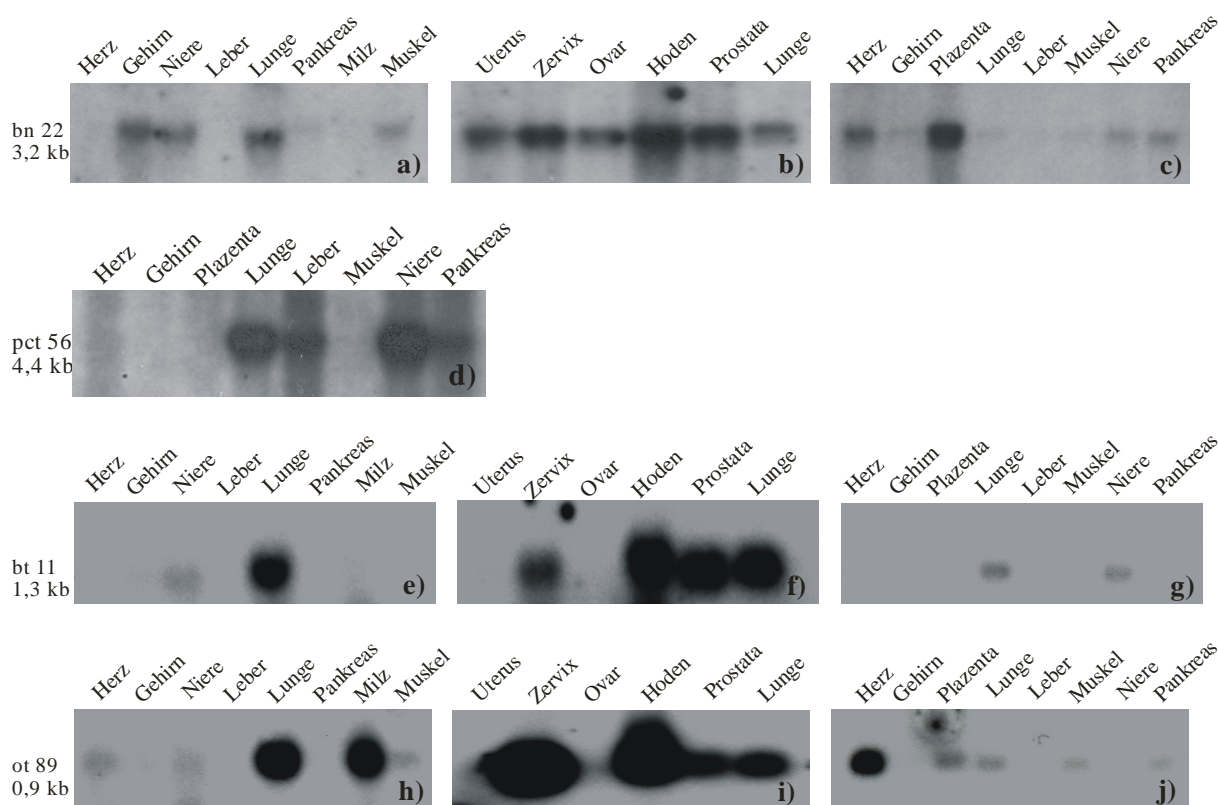


Abbildung 14: Auswertung der Northern-Blot-Analysen an Normalgeweben für die Kandidatengene ITIH5 (bn 22) (a – c), PIGR (pct 56) (d), capG (bt 11) (e – g) und FABP5 (ot 89) (h – j). Hybridisiert wurden der „Northern Territory TM – Human Normal Tissue Blot I“ (a, e, h), der „Hu Normal mRNA Blot IV“ (b, f, i) und der „Human MTN Blot“ (c, d, g, j) mit spezifischen Sonden für das jeweilige Kandidatengen. Die auf den Blots aufgetragenen mRNA's wurden in der Abbildung beschriftet. Die Größe der hybridisierten Banden wurde mit Hilfe einer auf den Northern-Blots markierten RNA-Leiter ermittelt. Sie beträgt für ITIH5 (bn 22) 3,2 kb, PIGR (pct 56) 4,4 kb, capG (bt 11) 1,2 kb und FABP5 (ot 89) 0,9 kb.

Tabelle 8: Auswertung der Expression der untersuchten Kandidatengene an Normalgeweben, analysiert mittels Northern-Blot.

	ITIH5 (bn 22) ↓	PIGR (pct 56) ↓	capG (bt 11) ↑	FABP5(ot 89)↓↑
Bandengröße	3,2 kb	4,4 kb	1,2 kb	0,9 kb
Herz	+	-	-	+
Gehirn	+	-	-	-
Niere	+	+++	+	+
Leber	-	+	-	-
Lunge	++	+++	++	++
Pankreas	+	+	-	-
Milz	-	/	-	++
Muskel	+	-	-	+
Uterus	++	/	-	+
Zervix	+++	/	+	+++
Ovar	++	/	-	+
Hoden	+++	/	+++	+++
Prostata	+++	/	++	++
Plazenta	+++	-	-	+

- = keine Expression, + = Expression, ++ = mittlere Expression, +++ = starke Expression, / = nicht untersucht

3.3.3 Expressionsanalysen an verschiedenen Mammakarzinomzelllinien

Es wurden mit den im Labor vorhandenen Mammakarzinomzelllinien BT 474, EFM 19, KS wt, MCF 7, MCF 10a, MFM 223 und SKB R3 nach bereits beschriebenem Protokoll (siehe 2.1.4) Echtzeit-PCR-Analysen durchgeführt. Mit den dadurch erhaltenen Expressionsdaten konnte eine Auswahl der Zelllinien für die funktionellen Analysen getroffen werden (Tabelle 9). Die Messung der Expression erfolgte im Vergleich zu einer Zellkultur von Normalgewebe (MRP03). Es konnte überraschenderweise festgestellt werden, dass keine der Zelllinien die putativen Onkogene stark exprimiert. Es wurden für die folgenden funktionellen Analysen alle Zelllinien verwendet, deren Expression für das jeweilige Gen gegenüber MRP03 über 2 x herunter reguliert war. Dazu gehören die Zelllinien BT 474, EFM 19, KS wt, MFM 223 und SKB R3 für die Analysen von bn 22. Die Zelllinien BT 474, EFM 19, KS wt, MCF 7, MCF 10 a, MFM 223 und SKB R3 sind für die Analysen von bn 39 geeignet. Für die Analysen von pct 56 wurden die Zelllinien EFM 19, KS wt, MCF 7, MCF 10 a, MFM 223 und SKB R3 ausgewählt. Die Zelllinien BT 474, EFM 19, KS wt, MCF 7, MCF 10 a, und SKB R3 eignen sich für die Analysen von bt 11. Die Zelllinien BT 474, EFM 19 und SKB R3 ermöglichen die Analysen von ot 59. Außerdem wurden die Zelllinien BT 474, EFM 19, KS wt, MCF 7, MFM 223 und SKB R3 für die Analysen von ot 89 ausgewählt.

Tabelle 9: Auswertung der Expression der untersuchten Kandidatengene an Zelllinien analysiert mittels Echtzeit-PCR.

	MRP 03	BT 474	EFM 19	KS wt	MCF 7	MCF 10a	MFM 223	SKB R3
ITIH5 (bn 22)↓	1,00	0,14	0,02	0,03	0,71	0,91	0,05	0,01
α-B-Crystallin (bn 39)↓	1,00	0,00	0,00	0,00	0,01	0,00	0,00	0,07
PIGR (pct 56)↓	1,00	0,80	0,02	0,26	0,04	0,01	0,03	0,11
capG (bt 11)↑	1,00	0,03	0,30	0,13	0,06	0,07	0,88	0,04
14-3-3ζ (ot 59)↑	1,00	0,46	0,40	0,86	0,88	0,62	0,60	0,38
FABP5 (ot 89)↑↓	1,00	0,03	0,00	0,01	0,44	1,36	0,12	0,03

Dargestellt ist das Expressionsverhältnis der sechs Kandidatengene in verschiedenen Mammakarzinomzelllinien zu MRP 03. Alle Zelllinien in denen die Expression mehr als 2x niedriger war als in MRP03 sind fett markiert.

3.4 Untersuchung der Expression der sechs ausgewählten Kandidatengene auf Proteinebene

3.4.1 Expression rekombinanter Proteine

An allen sechs untersuchten Kandidatengenen sollten immunhistochemische Expressionsanalysen durchgeführt werden. Dafür sind für diese Proteine spezifische Antikörper notwendig. Für die zwei Kandidatengene α -B-Crystallin (bn 39) und PIGR (pct 56) waren monoklonale Antikörper bereits kommerziell erhältlich. Für die vier weiteren Kandidatengene (ITIH5 (bn 22), capG (bt 11), 14-3-3 zeta (ot 59) und FABP5 (ot 89)) sollten polyklonale Antikörper hergestellt werden. Die Herstellung der Antikörper sollte bei der Firma Eurogentec durch die Immunisierung von jeweils 2 Kaninchen mit bakteriell exprimiertem Protein nach Standardprotokoll erfolgen. Die in den Expressionsvektor pET 29a klonierten offenen Leserahmen wurden in entsprechende Expressionsbakterien transformiert. Die Expressionsversuche erfolgten nach optimiertem Protokoll. Um einen hohen Reinheitsgrad der rekombinanten Proteine zu gewährleisten, wurden diese durch Affinitätschromatographie aus dem Bakterienlysat aufgereinigt und die gewonnenen Proteinfractionen zusätzlich einer Gelfiltration unterzogen. Damit war es möglich, Proteine mit hoher Reinheit herzustellen. Für die Immunisierung war es notwendig, die Proteine zu konzentrieren und in 1 x PBS zu überführen.

Es wurden Expressionsversuche mit verschiedenen Expressionsstämmen von *E. coli* zur Expression von ITIH5 (bn 22) durchgeführt. Die Expressionsversuche mit dem Stamm *E. coli* BL21(DE3) wurden nach Standardprotokoll durchgeführt. Außerdem wurde der *E. coli*-Stamm Rosetta(DE3) auf die Expression von ITIH5 (bn 22) untersucht. Bei beiden Expressionsversuchen wurden induzierte Proteine gefunden, welche jedoch keine Volllängenprodukte darstellten (Daten nicht gezeigt). Eine weitere Möglichkeit bot das für die Expression schwieriger Proteine geeignete Bakterium *E. coli* BL21-Codon Plus(DE3)-RIL. Die Expression von ITIH5 (bn 22) konnte hier jedoch nicht nachgewiesen werden. Auch nach Veränderung der Versuchsbedingungen konnte in den *E. coli*-Stämmen BL21(DE3) und Rosetta (DE3) keine Expression von Volllängenprodukten erreicht werden.

Die Expressionsversuche von capG (bt 11) wurden nach Angaben aus der Literatur (Dabiri et al. 1992) mit dem *E. coli*-Stamm BL21(DE3) durchgeführt. Nach diesen Angaben sollte bei einer optischen Dichte der Bakterienkultur von OD₅₉₅ = 0,6 mit 0,4 mM IPTG die Proteinexpression induziert werden und nach 5h Inkubation bei 37 °C eine große Menge exprimiertes Protein vorliegen. Es war allerdings auch mit veränderten Induktionsbedingungen nur

möglich, geringe Mengen des Proteins zu exprimieren. Nach der Aufreinigung im analytischen Maßstab wurde jedoch in der erwarteten Fraktion kein Protein gefunden. Dieses Ergebnis wurde bei mehreren auf Expression untersuchten Klonen bestätigt (Daten nicht gezeigt). Außerdem wurden die *E. coli*-Stämme Rosetta(DE3) und BL21-Codon Plus(DE3)-RIL auf die Expression von capG (bt 11) hin untersucht. Bei den Expressionsversuchen in *E. coli* Rosetta(DE3) wurden induzierte Proteine gefunden, welche jedoch keine Vollständigkeitsprodukte darstellten. Eine Expression von capG (bt 11) konnte bei *E. coli* BL21-Codon Plus(DE3)-RIL nicht nachgewiesen werden.

Die Expressionsversuche von rekombinantem Protein für 14-3-3 zeta (ot 59) wurden nach Standardprotokoll mit dem *E. coli*-Stamm BL21(DE3) durchgeführt. Es war möglich, das Protein in großen Mengen zu exprimieren. Bei der Aufreinigung im analytischen Maßstab wurde jedoch das exprimierte Protein bereits mit dem ersten Waschpuffer eluiert. Dieses Ergebnis wurde bei mehreren auf Expression untersuchten Klonen bestätigt (Daten nicht gezeigt).

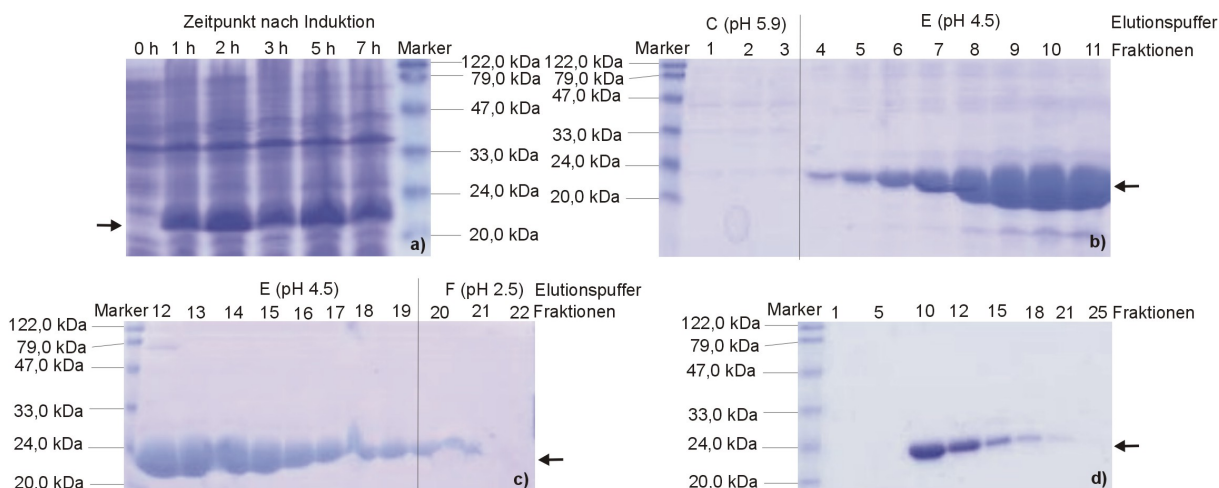


Abbildung 15: Darstellung der Aufreinigung des exprimierten Proteins FABP5 (ot 89). a) elektrophoretische Auftrennung der, bei den Expressionsversuchen induzierten Proteine von FABP5 (ot 89) in einem 17%igen PAA-Gel. b)-c) Darstellung der Proteinfraktionen nach affinitätschromatographischer Aufreinigung über Ni-NTA-Agarose. d) Fraktion 9 der affinitätschromatographischen Aufreinigung wurde der Gelfiltration unterzogen. Die elektrophoretisch aufgereinigten Fraktionen 10-12 wurden zur Immunisierung der Kaninchen in 1x PBS umgepuffert. Die Proteinbande bei 22 kDa ist mit einem Pfeil markiert.

Die hier dargestellten Ergebnisse zur Expression rekombinanter Proteine für FABP5 (ot 89) wurden nach Standardprotokoll mit dem *E. coli*-Stamm BL21(DE3) durchgeführt. Bei einer optischen Dichte der Bakterienkultur von OD₅₉₅ = 0,5 wurde mit 1 mM IPTG die Proteinexpression induziert. Nach dreistündiger Inkubation bei 37 °C lag eine große Menge exprimiertes Protein vor. Bei der Aufreinigung im analytischen Maßstab wurde das rekombinante Protein im entsprechenden Eluat gefunden. In der anschließenden präparativen

Aufreinigung konnten ausreichende Mengen an Protein gewonnen werden. Die Aufreinigung erfolgte in der beschriebenen Vorgehensweise über Ni-NTA-Agarose und Gelfiltration (Abb. 15). Nach Umpuffern und Konzentrierung wurde das Protein mit einer Konzentration von 300 µg/ml an eurogentec zur Immunisierung von Kaninchen versandt.

3.4.2 Immunhistochemische Untersuchungen

3.4.2.1 Nachweis der Spezifität der verwendeten Antikörper

Anhand der immunhistochemischen Untersuchung besteht die Möglichkeit, die Expression von Proteinen im Gewebe zu lokalisieren und zwischen Tumorgeweben und Normalgeweben direkt zu vergleichen. Damit können die zur Transkription der mRNA gesammelten Daten auf Proteinebene bestätigt werden. Bei der Immunhistochemie wurden spezifische monoklonale Antikörper gegen α -B-Crystallin (bn 39) und PIGR (pct 56) und polyklonale Antiseren gegen das Gesamtprotein von FABP5 (ot 89) eingesetzt.

Zur Überprüfung der Spezifität der verwendeten Antikörper wurden mit der entsprechenden cDNA transfizierte COS-7-Zellen in einer Immunfluoreszenzreaktion untersucht. Es konnte in den mit bn 39 und pct 56 transfizierten Zellen eine spezifische zytoplasmaständige Färbung beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Mit Kontrollgenen transfizierte Zellen zeigten nach Reaktion mit den spezifischen Seren keine Färbung. Bei der Immunfluoreszenzreaktion gegen exprimiertes ot 89 konnten bisher mit den verwendeten Antiseren der Firma eurogentec nur unspezifische Reaktionen beobachtet werden.

Die Spezifität der Antiseren gegen exprimiertes ot 89 sollte außerdem in einem Western-Blot überprüft werden. Der Nachweis einer spezifischen Bande konnte für ot 89-transfizierte Zellen nach Hybridisierung mit dem affinitätschromatografisch aufgereinigten Antiserum von eurogentec erbracht werden (Abb. 16).

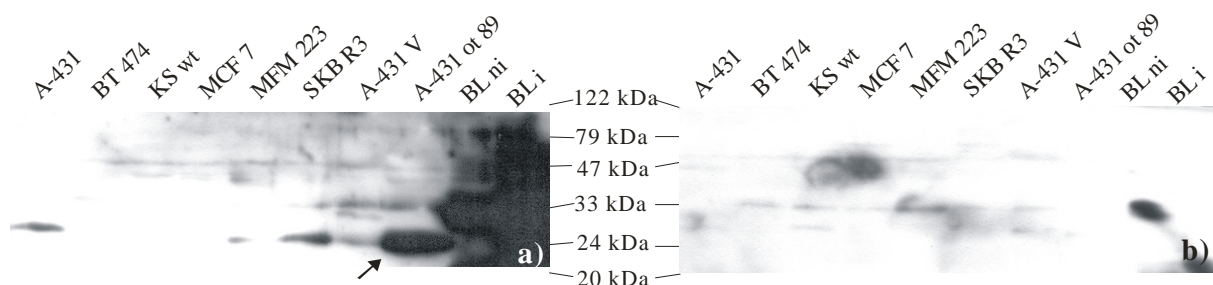


Abbildung 16: Western-Blot mit Proteinextrakten aus Zelllinien und bakteriell exprimiertem Protein von ot 89. Hybridisiert wurde mit dem affinitätschromatografisch aufgereinigten Antiserum (a) und dem Präimmunserum (b) als Negativkontrolle. Aufgetragen sind Proteinextrakte aus Mammakarzinomzelllinien, aus der mit dem Leervektor pBK-CMVΔ (A-431 V) und mit dem Kandidatengen ot 89 transfizierten Zelllinie A-431 und zur Aufreinigung rekombinanten Proteins verwendetes Bakterienlysat (BL ni = nicht induziert, BL i = induziert). Das Protein hat die erwartete Größe von ca. 22 kDa (siehe →).

3.4.2.2 Immunhistochemische Untersuchungen an Gewebeschnitten

Um die differentielle Expression der Kandidatengene auf Proteinebene zu überprüfen, wurden immunhistochemische Untersuchungen an jeweils 20 duktalem Karzinomen der Mamma und 20 Normalgeweben der Mamma durchgeführt. Es wurden die gleichen Biopsien wie für die RNA-RNA-*in situ*-Hybridisierung verwendet. Die Auswertung dieser Experimente erfolgte mikroskopisch durch Abschätzen der Signalintensität in den jeweiligen Schnitten. Da bei den Immunfluoreszenzuntersuchungen mit den Antiseren gegen FABP5 (ot 89) nur unspezifische Reaktionen beobachtet wurden, sind bisher keine immunhistochemischen Untersuchungen durchgeführt worden. Bei der Auswertung der immunhistochemischen Analyse mit Alpha-B-Crystallin-spezifischem Antikörper (bn 39, *rabbit anti Alpha B Crystallin*) wurden ausschließlich schwache und unspezifische Signale gefunden. Die immunhistochemische Untersuchung für PIGR (pct 56, NCL-SCO5) ergab bei den analysierten Normalgeweben eine sehr stark positive Reaktion (Abb. 17). Sie lokalisierte innerhalb der Drüsenzellen. Die Bindegewebe und Fettgewebe reagierten negativ. Im Tumorgewebe sind schwach positive Areale detektierbar. Allerdings war auch hier bei einigen Zellen eine stark positive Reaktion zu finden.

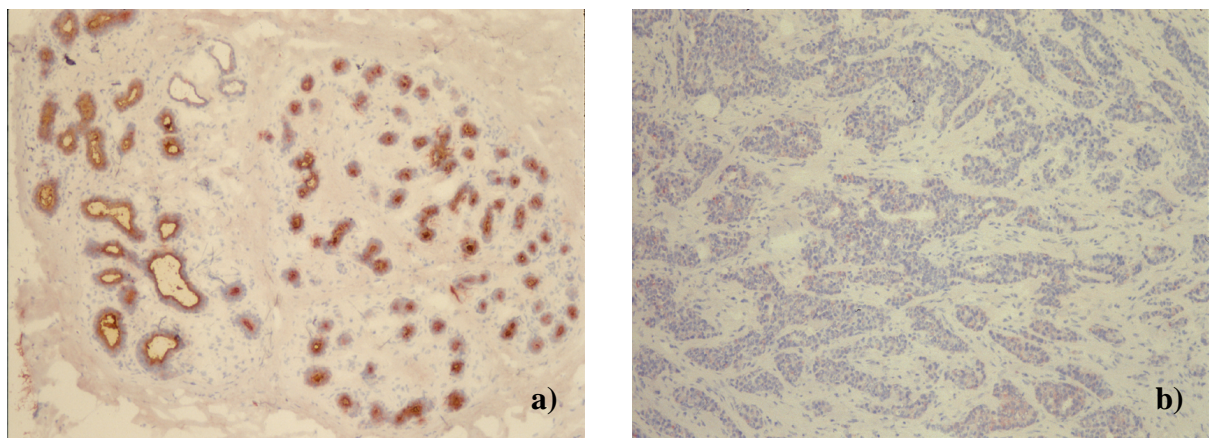


Abbildung 17: Beispiel für die immunhistochemische Untersuchung gegen PIGR (pct 56). a) Hellfeldaufnahme von Normalgewebe der Mamma, b) Hellfeldaufnahme eines Tumors der Mamma. verwendeter Antikörper NCL-SCO5, Vergrößerung 10x, nach HE-Färbung.

3.5 Funktionelle Analysen

3.5.1 Invasionsassay

Mit Hilfe des hier verwendeten Invasionsassays lässt sich die Fähigkeit von tumorigenen Zelllinien zur Proteolyse von extrazellulärer Matrix und zur Migration durch poröse Membranen nachweisen.

Alle vorhandenen Mammakarzinomzelllinien wurden auf ihre Fähigkeit zur Invasivität hin untersucht. Als Vergleich (Positivkontrolle) diente die als invasiv beschriebene Zelllinie HT 1080. In diesem Experiment wurden die Zelllinien MFM 223 und SKB-R3 als invasive Zelllinien identifiziert. Dabei ist MFM 223 schwach und SKB-R3 stärker invasiv.

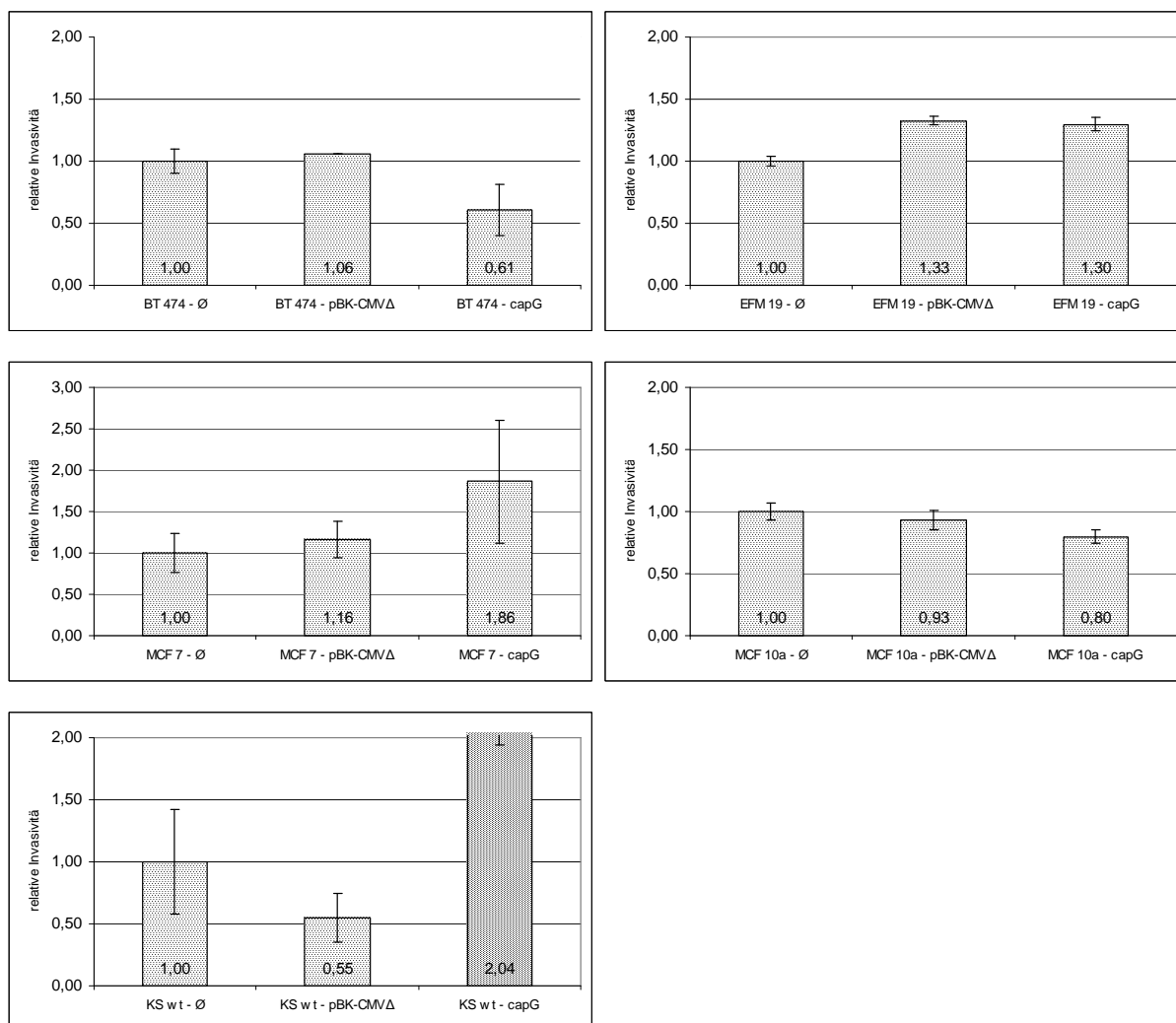


Abbildung 18: Untersuchung von capG (bt 11) auf Invasivität. Transfiziert wurden die nicht invasiven Zelllinien BT 474, EFM 19, KS wt, MCF 7 und MCF 10a mit dem Kandidatengen bt 11 und dem Leervektor pBK-CMVΔ. Verglichen wurde die Invasivität mit den entsprechenden untransfizierten Zellen. Auf der Abszisse wurden die untersuchten Transfektionen und auf der Ordinate die relative Invasivität als willkürliche Einheit dargestellt.

Im folgenden Versuch wurden die Kandidatengene, welche möglicherweise Funktionen in der Regulation der Migration und Invasivität von Zellen haben, in Zelllinien transfiziert, welche diese Gene gemessen mit Echtzeit-PCR nicht oder nur sehr schwach exprimieren (siehe Tabelle 9, S. 54). Als Kontrollen wurden Transfektionen mit EGFP (Effizienz) und dem Leervektor pBK-CMVΔ durchgeführt. CapG (bt 11) wurde in die nicht invasiv wachsenden Zelllinien BT 474, EFM 19, KS wt, MCF 7 und MCF 10a transfiziert. Das Gen ITIH5 (bn 22)

wurde in die invasiven Zelllinien MFM 223 und SKB-R3 transfiziert. Die Transfektanten wurden 14 Tage mit G418 selektioniert, so dass nur Zellen, die den Resistenzmarker und damit das Expressionsplasmid tragen, in den Invasionsassay eingesetzt wurden. Eine statistische Auswertung war durch die geringe Probenzahl nicht möglich.

Es stellte sich heraus, dass nach Transfektion der nicht invasiven Zelllinien mit capG (bt 11) nur die Zelllinie KS wt mit invasivem Wachstum reagierte (Abb. 18).

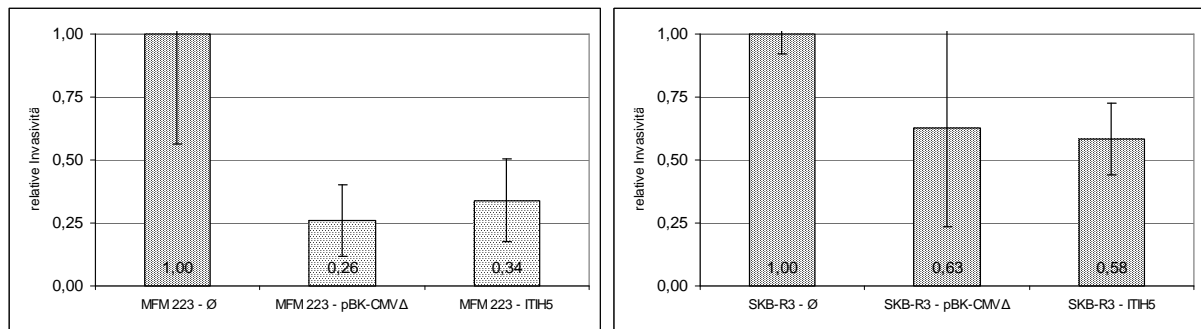


Abbildung 19: Untersuchung von ITIH5 (bn 22) auf Invasivität. Transfiziert wurden die invasiven Zelllinien MFM 223 und SKB-R3 mit den Kandidatengenen bn 22 und dem Leervektor pBK-CMVΔ. Verglichen wurde die Invasivität mit den entsprechenden untransfizierten Zellen. Auf der Abszisse wurden die untersuchten Transfektionen und auf der Ordinate die relative Invasivität als willkürliche Einheit dargestellt.

Die transfizierte invasive Zelllinie MFM 223 wächst bereits nach Transfektion mit dem Leervektor nicht mehr invasiv (Abb. 19). Das ändert sich auch durch Transfektion mit dem Kandidatengen ITIH5 (bn 22) nicht. Für die transfizierte invasive Zelllinie SKB-R3 ergibt sich keine Änderung ihrer Invasivität.

3.5.2 Proliferationsanalysen

Mit der ersten der beiden in dieser Arbeit verwendeten Analysemethoden zur Proliferation, dem Proliferationsassay mit WST-1, soll die Fähigkeit der Zelllinien zum schnelleren oder gehemmten Wachstum nach Transfektion mit potentiellen Onkogenen bzw. Tumorsuppressorgenen untersucht werden. Mit der zweiten Analyse, dem *Colony Formation Assay*, soll die Möglichkeit von transfizierten Tumorzellen, ihr Medium zu konditionieren und ihre Fähigkeit, unabhängig von benachbarten Zellen zu wachsen, analysiert werden. Die sechs Kandidatengene wurden in Zelllinien transfiziert, welche diese Gene laut Echtzeit-PCR nicht exprimieren (siehe Tabelle 9, S. 54). Für den Proliferationsassay mit WST-1 waren nur Zelllinien nutzbar, welche in DMEM als Medium wachsen, da hier DMEM ohne Phenolrot verwendet wurde. Als Kontrollen wurden Transfektionen mit EGFP (Effizienz) und dem Leervektor pBK-CMVΔ durchgeführt. Im Proliferationsassay mit WST-1 wurden die Zellen

in einem Zeitraum von 24 h bis 72 h nach Transfektion auf veränderte Wachstumsgeschwindigkeit untersucht. Aufgrund der Anzahl von Parallelversuchen konnte dieses Experiment auch statistisch, mit Hilfe des Lord-Tests, ausgewertet werden. Im *Colony Formation Assay* erfolgte die Analyse des klonalen Wachstums erst nach 14tägiger Selektion mit G418.

Tabelle 10: Auswertung des Proliferationsassay mit WST-1.

Gen	+	k. E.	-
ITIH5 (bn 22)↓	0/3	1/3	<u>2/3</u>
α-B-Crystallin (bn 39)↓	1/3	1/3	1/3
PIGR (pct 56)↓	1/3	1/3	1/3
capG (bt 11)↑	<u>2/3</u>	1/3	0/3
14-3-3ζ (ot 59)↑	1/2	1/2	0/2
FABP5 (ot 89)↓↑	0/3	2/3	1/3

Durchgeführt wurde die Analyse an verschiedenen Mammakarzinomzelllinien, transfiziert mit allen sechs Kandidatengenen. Dargestellt ist die Anzahl beobachteter Wachstumseffekte. Abkürzungen: k. E. = kein Wachstumseffekt, + = positiver Wachstumseffekt, - = negativer Wachstumseffekt

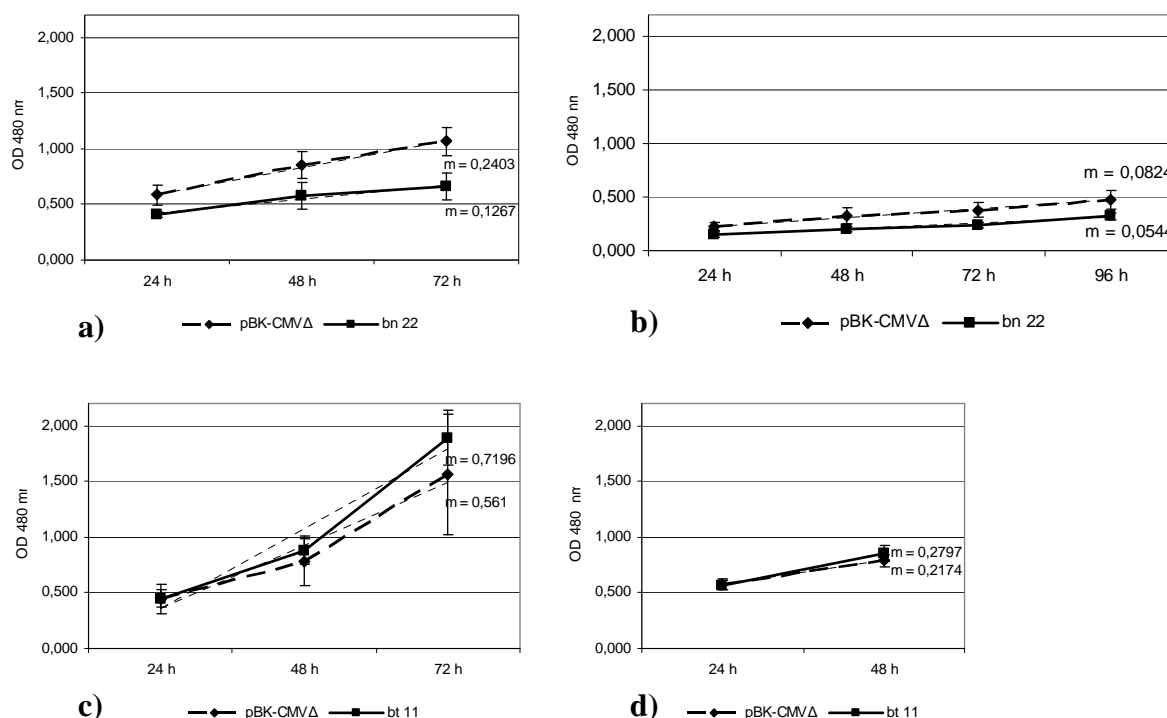


Abbildung 20: Grafische Darstellung des gemessenen Umsatzes von WST-1. Dargestellt sind die statistisch nachgewiesenen Wachstumsänderungen nach Transfektion mit ITIH5 (bn 22) in den Zelllinien EFM 19 (a) und MFM 223 (b), und nach Transfektion mit capG (bt 11) in den Zelllinien KS wt (c) und MCF 7 (d). Auf der Abszisse wurde der Meßzeitraum in Tagen und auf der Ordinate die Extinktion bei 480 nm dargestellt.

Im Proliferationsassay mit WST-1 war für die beiden exprimierten Proteine ITIH5 (bn 22) und capG (bt 11) eine eindeutige Veränderung im Proliferationsverhalten erkennbar (Tabelle 10 und Abb. 20). Bei ITIH5 (bn 22) fand in zwei von drei Zelllinien (EFM 19 und MFM 223) eine statistisch nachweisbare Verringerung der Wachstumsgeschwindigkeit statt. Für capG (bt 11) war zu beobachten, dass in zwei von drei Zelllinien (KS wt und MCF 7) die Wachstumsgeschwindigkeit trotz hoher Standardabweichungen leicht erhöht war. Auch bei den übrigen transfizierten Genen waren veränderte Wachstumsgeschwindigkeiten zu beobachten. Dort waren diese allerdings in weniger Zelllinien erkennbar und damit nicht relevant. Außerdem wurden auch gegensätzliche Proliferationsgeschwindigkeiten, wie z.B. bei Alpha-B-Crystallin (bn 39) und PIGR (pct 56) gefunden.

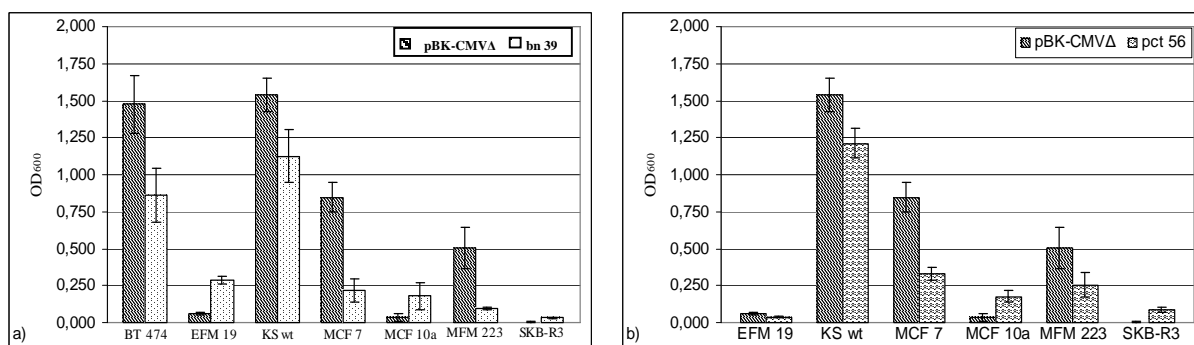
Die Ergebnisse des *Colony Formation Assay* stellten sich ähnlich differenziert dar (Tabelle 11). Eine statistische Auswertung der Analyse war aufgrund der niedrigen Zahl durchgeführter Parallelexperimente nicht möglich.

Für das putative Tumorsuppressorgen PIGR (pct 56) konnte in vier von sechs Zelllinien (EFM 19, KS wt, MCF 7 und MFM 223) eine verringerte Koloniebildung beobachtet werden (Abb. 21a). Das gleiche Ergebnis zeigte sich in vier Zelllinien (BT 474, KS wt, MCF 7 und MFM 223), welche mit α -B-Crystallin (bn 39) transfiziert wurden (Abb. 21b). Bei allen weiteren untersuchten Genen fielen die Ergebnisse sehr heterogen aus, es zeigte sich eine reduzierte oder verstärkte Koloniebildung in der gleichen Zahl von untersuchten Zelllinien.

Tabelle 11: Auswertung des *Colony Formation Assay*.

Gen	+	k. E.	-
α-B-Crystallin (bn 39)↓	2/7	1/7	<u>4/7</u>
PIGR (pct 56)↓	2/6	0/6	<u>4/6</u>
capG (bt 11)↑	2/6	1/6	3/6
14-3-3ζ (ot 59)↑	1/3	1/3	1/3
FABP5 (ot 89)↓↑	2/6	2/6	2/6

Durchgeführt wurde der CFA an verschiedenen Mammakarzinomzelllinien, transfiziert mit allen sechs Kandidatengenen. Dargestellt ist die Anzahl der beobachteten Effekte, Abkürzungen: k. E. = kein Effekt, + = positiver Effekt, - = negativer Effekt



Zelllinie	BT 474	EFM 19	KS wt	MCF 7	MCF 10a	MFM 223	SKB-R3
bn 39	↓↓	↑↑	↓	↓↓↓	↑	↓↓	↑

Zelllinie	EFM 19	KS wt	MCF 7	MCF 10a	MFM 223	SKB-R3
pct 56	↓	↓	↓↓	↑	↓	↑↑

Abbildung 21: Auswertung des Colony Formation Assay für α-B-Crystallin (bn 39) und PIGR (pct 56). Dargestellt sind die gemessenen Unterschiede in der Zellzahl nach stabiler Transfektion mit a) α-B-Crystallin (bn 39) und b) PIGR (pct 56) in allen untersuchten Zelllinien. Zur Kontrolltransfektion wurde der Leervektor pBK-CMVΔ verwendet. Auf der Abszisse wurden die transfizierten Zelllinien und auf der Ordinate die gemessene Extinktion bei 600 nm dargestellt.

In der folgenden Tabelle sind die Ergebnisse aller drei funktionellen Analysen zusammenfassend dargestellt. Effekte auf Invasivität oder Wachstum von verschiedenen Zelllinien waren nach Transfektion mit den Vollklonen für ITIH5 (bn 22), α-B-Crystallin (bn 39), PIGR (pct 56) und capG (bt 11) erkennbar.

Tabelle 12: Zusammenfassung der Ergebnisse der in dieser Arbeit durchgeführten funktionellen Analysen.

	Invasion	Proliferation	Colony Formation
ITIH5 (bn 22)↓	k. E.	-	n. d.
α-B-Crystallin (bn 39)↓	n. d.	k. E.	-
PIGR (pct 56)↓	n. d.	k. E.	-
capG (bt 11)↑	+	+	k. E.
14-3-3ζ (ot 59)↑	n. d.	k. E.	k. E.
FABP5 (ot 89)↓↑	n. d.	k. E.	k. E.

Abkürzungen: n. d. = nicht durchgeführt, k. E. = kein Effekt, + = positiver Effekt, - = negativer Effekt.

4 Diskussion

Ziel dieses Konsortiumsprojekts war die Identifizierung und Validierung von neuen Genen, die an der Entstehung sporadischer Formen des Brust-, Eierstock- und Endometriumkarzinoms beteiligt sind. Tumorassoziierte Gene zu finden und die Signalkaskaden zu entschlüsseln, an denen sie beteiligt sind, könnte zu einer Verbesserung von Tumordiagnose und -therapie führen. Die wichtigsten Ziele des Gesamtprojekts waren die Identifizierung und Charakterisierung neuer Tumorsuppressor- und Onkogene sowie die Beschreibung der Stoffwechselwege, in denen diese Gene involviert sind. Außerdem sollten neue krebs-spezifische Markergene für diagnostische Anwendungen identifiziert werden.

Die Ziele der vorliegenden Arbeit waren die folgenden: Nach der Nominierung von Kandidatengenen sollte eine Bestätigung ihrer differentiellen Expression in Tumor- gegenüber Normalgewebe stattfinden. Dies wurde durch die Hybridisierung von cDNA-Dot-Blots und die Durchführung von Echtzeit-PCRs erreicht. Durch RNA-RNA-*in situ*-Hybridisierungen und immunhistochemische Untersuchungen konnten die Daten zur differentiellen Expression an den ausgewählten Kandidatengenen nochmals überprüft werden. Mit anschließenden funktionellen Studien, wie Invasions- und Proliferationsanalysen mit den ausgewählten Kandidatengenen, konnten Einblicke in ihre Funktion in gynäkologischen Karzinomen gewonnen werden. Die durchgeführten Experimente beschränkten sich auf die Analyse der Genexpression in sporadischen Formen des Brustkrebses.

4.1 Validierung der Expression potentieller Tumorsuppressor- und Onkogene

Die Datenbankanalyse zur Genexpression von gynäkologischen Karzinomen („*in silico*-Analyse“) wurde in der Firma metaGen (Berlin) durchgeführt (Schmitt et al., 1999). Es wurden mehr als 600 Gene identifiziert, die bei diesen Analysen eine signifikant differentielle Expression in Brust-, Eierstock- und Endometriumkarzinomen zeigten. Eine Untergruppe von 235 Genen, welche in gynäkologischen Karzinomen oft verändert vorliegen, wurde für weitere Analysen ausgewählt. Aus dieser Gruppe wurden 50 Kandidatengene gewählt, die nach dem wissenschaftlichen Erkenntnisstand sehr aussichtsreich erscheinen. Im Rahmen dieser Arbeit wurden davon 15 potentielle Tumorsuppressorgene und 5 putative Onkogene zur Bestätigung ihrer differentiellen Expression in Tumor- und Normalgewebe der Mamma untersucht.

Als Methoden zur Verifikation der differentiellen Genexpression wurden die Hybridisierung von cDNA-Dot-Blots und die Durchführung von Echtzeit-PCRs ausgewählt. Diese beiden Methoden boten die Möglichkeit, auch bei limitierter Probenmenge die Expression relativ weniger Gene an einer hohen Zahl von Patientenproben zu untersuchen. Für die cDNA-Dot-Blots wurden PCR-Produkte verwendet, da diese sehr genau charakterisierbar waren. Die gewählten Bedingungen für die Auswahl der PCR-Primer waren: eine ähnliche Schmelztemperatur der Primer, eine ähnliche Länge der resultierenden PCR-Produkte und ihre Lage im 3'-Bereich der mRNA. Die Sequenzen der resultierenden PCR-Produkte wurden mit Hilfe der Software BLAST gegen die Datenbank des NCBI abgeglichen. Damit konnten genaue Aussagen über die Lage des PCR-Produktes in einem Gen und die Spezifität für das jeweilige Gen innerhalb einer Genfamilie getroffen werden. Von den 33 für die Versuche ausgewählten Primerpaaren wurden 20 (cDNA-Dot-Blot) bzw. 18 (Echtzeit-PCR) verwendet, da mit diesen eindeutig spezifische PCR-Produkte synthetisiert wurden. Bei den cDNA-Dot-Blots wurden die erhaltenen Signale mit Hilfe eines Phosphorimagers quantifiziert und damit Genexpressionsunterschiede zwischen verschiedenen Geweben ermittelt. Dabei waren bei der Hybridisierung mit einer Gewebeprobe für alle cDNA-Klone die Versuchsbedingungen gleich. Für die Echtzeit-PCR wurden die gleichen RNA-Präparationen und PCR-Primer wie für die cDNA-Dot-Blots eingesetzt. Das ermöglichte einen Vergleich der aus beiden Methoden erhaltenen Daten. Vorteile der Echtzeit-PCR sind die hohe Sensitivität, die gute Reproduzierbarkeit und der große dynamische Messbereich. Die Echtzeit-PCR wurde schon mehrfach erfolgreich zur Detektion und Quantifizierung einer veränderten Genexpression bei sporadischen Mammakarzinomen eingesetzt (Glöckner, S. et al. 2000, Bieche, I. et al. 2001, Bieche, I. et al. 1999). Bei der hier durchgeführten Echtzeit-PCR ist nur eine relative Quantifizierung der mRNA möglich, da der eingesetzte Standard aus Plasmid-DNA besteht. Es kann jeweils nur ein Gen in einer PCR untersucht werden. Um die Vergleichbarkeit der einzelnen PCRs zu gewährleisten, ist zu beachten, dass die Reaktionseffizienzen der einzelnen Reaktionen möglichst ähnlich sind.

Als Nachteil für die Auswertung der hier durchgeführten Quantifizierungsexperimente ist die geringe Zahl an eingesetzten Normalgewebeproben anzusehen. Dies verhindert eine statistische Absicherung der Ergebnisse. Optimal wäre die Analyse von Gewebepaaren aus jeweils einer Patientin gewesen. Es konnten leider keine Gewebepaare verwendet werden, da das vorhandene Normalgewebe meist zu geringe Mengen an Drüsenzellen aufwies. Da nur eine limitierte Menge an RNA aus den vier verwendbaren Normalgewebeproben vorhanden war, mussten diese, um eine einheitliche Auswertung der Daten zu gewährleisten, für die

Quantifizierungsexperimente in einem Gemisch eingesetzt werden. Zur Kontrolle der Repräsentativität des RNA-Gemisches in den cDNA-Dot-Blots wurde die normalisierte Expression der PCR-Produkte zwischen den vier cDNAs aus den einzelnen Normalgewebeproben und dem Gemisch verglichen. Hierbei stellte sich eine sehr gute Übereinstimmung im Grad der Schwärzung heraus. Damit konnte gezeigt werden, dass das RNA-Gemisch die Expression der einzelnen Gene im Normalgewebe gut wiedergibt (Daten nicht gezeigt). Der Kontrollversuch zur Repräsentativität des RNA-Gemisches aus den Normalgewebeproben wurde auch für die Echtzeit-PCR durchgeführt. Bei der Auswertung der Expressionsverhältnisse zwischen dem RNA-Gemisch der Normalgewebe und den entsprechenden Einzeldaten fällt auf, dass bei den beiden potentiellen Tumorsuppressorgenen bn 48 und on 27 in den Normalgeweben eine stark differierende Expression zu erkennen ist. Aus diesem Grund sollten für diese Gene die gefundenen Expressionsunterschiede zwischen Tumor- und Normalgewebe nicht als gesichert angenommen und noch weitere Normalgewebe untersucht werden. Bei allen anderen analysierten Kandidatengen wurde eine gute Übereinstimmung zwischen den cDNAs aus den einzelnen Normalgewebeproben und dem Gemisch festgestellt.

Anhand der in dieser Arbeit gesammelten Daten lässt sich eine Bestätigung der „*in silico*-Analysen“ in vielen Fällen zeigen. Mit den beiden hier verwendeten Quantifizierungsmethoden ließen sich ein Drittel der als differentiell transkribiert ermittelten Gene in ihrer Expression bestätigen. Mittels cDNA-Dot-Blot wurden für die Mehrzahl der untersuchten potentiellen Tumorsuppressorgene die theoretisch erstellten Expressionsdaten bestätigt. Eine Ausnahme bilden bei dieser Methode die putativen Onkogene. Es konnte bei keinem der untersuchten Gene eine eindeutige Heraufregulation gefunden werden. Gründe hierfür sind in dem geringen dynamischen Messbereich der verwendeten Methode zu suchen. Nach der Exposition mit BioImager-Platten und Auswertung mit dem Programm AIDA Ver 3.00 waren niedrig exprimierte Gene, darunter auch die Haushaltsgene, gut auswertbar, einige stark exprimierte Gene jedoch bereits überexponiert und damit nicht mehr auszuwerten.

Für die Ergebnisse der Echtzeit-PCR lässt sich zusammenfassen, dass mit dieser Methode eine höhere Anzahl an Genen mit veränderter Expression im Verhältnis zum Normalgewebe als mit der Methode der cDNA-Dot-Blots nachweisbar war. Das lässt sich durch die bereits erwähnte höhere Sensitivität der Methode erklären. Außerdem war es mit dieser Methode möglich, die herauf regulierte Expression von potentiellen Onkogenen zu bestätigen. Durch den größeren dynamischen Messbereich der Echtzeit-PCR war es möglich, auch hoch exprimierte Gene zu quantifizieren.

Die mit den cDNA-Dot-Blots ermittelte sehr starke Herunterregulation der drei Kandidatengene ITIH5 (bn 22) (in 90 % der untersuchten Fälle), α -B-Crystallin (bn 39) (in 95 % der Fälle) und PIGR (pct 56) (in 95 % der Fälle) in Tumoren gegenüber Normalgeweben konnte in der Echtzeit-PCR (ITIH5 (bn 22) in 90 % der Fälle, α -B-Crystallin (bn 39) in 88 % und PIGR (pct 56) in 68 % der Fälle herunter reguliert) bestätigt werden. In die folgenden Untersuchungen aufgenommen wurden nach den Ergebnissen der Echtzeit-PCR außerdem capG (bt 11) und 14-3-3zeta (ot 59) als potentielle Onkogene, da ihre Expression in den Tumoren größtenteils herauf reguliert war. Das potentielle Onkogen FABP5 (ot 89) wurde ebenfalls weiter untersucht, da seine Expression in einigen Proben sehr stark reguliert war. Die drei putativen Tumorsuppressorgene ITIH5 (bn 22), α -B-Crystallin (bn 39) und PIGR (pct 56) und die drei potentiellen Onkogene capG (bt 11), 14-3-3 zeta (ot 59) und FABP5 (ot 89), die für weitere Analysen ausgewählt wurden, zeigten bei beiden Untersuchungsmethoden die größten Veränderungen der Transkriptionsrate in den analysierten Tumoren. Damit besteht die Hoffnung, dass diese Gene eine Bedeutung in der Entwicklung oder Progression von Tumoren der Mamma haben. Die hier vorgestellten Daten wurden innerhalb des Konsortiums durch weitere Echtzeit-PCR-Analysen (Taqman) und die Hybridisierung von „*human matched tumor/normal expression arrays*“ (Clontech) ergänzt und veröffentlicht (Dahl et al., 2005).

Zur Bestätigung der differentiellen Transkription der sechs Kandidatengene an Gewebe und zur Lokalisierung der Transkripte dieser Gene wurden RNA-RNA-*in situ*-Hybridisierungen mit den kompletten offenen Leserahmen als Hybridisierungssonde an jeweils 20 Tumor- und Normalgeweben der Mamma durchgeführt. Auf die Ergebnisse dieser Untersuchungen wird bei der Beschreibung der Kandidatengene im Einzelnen eingegangen. Zur Überprüfung der Spezifität der hier verwendeten Hybridisierungssonden wurde RNA aus mit dem entsprechenden offenen Leserahmen transfizierten Zellen in einem Northern Blot mit den verschiedenen *sense*- und *antisense*-Sonden hybridisiert (Daten nicht gezeigt). Bei den RNA-RNA-*in situ*-Hybridisierungen konnten leider keine Gewebepaare aus der gleichen Patientin verwendet werden.

Nach Abschluß der Validierungsexperimente wurden die sechs verschiedenen Kandidatengene, welche Expressionsveränderungen in Mammakarzinomen aufwiesen, funktionell analysiert. Verwendet wurden bei diesen Analysen ein klassischer Invasionsassay (Albini et al., 1987), ein *Colony Formation Assay* (Reuter et al., 1998) sowie eine Analysemethode für kurzzeitige Auswirkungen auf die Proliferation (Yano et al., 1994).

Invasion durch die extrazelluläre Matrix ist ein bedeutender Schritt in der Metastasierung von Tumoren. Tumorzellen binden an Blutgefäße und wandern daran entlang. Mit Hilfe von proteolytischen Enzymen wie MMP-Kollagenasen wird die extrazelluläre Matrix um Blutgefäße aufgelöst und die Krebszellen können in diese einwandern. Das putative Onkogen capG (bt 11) als β -Aktin modulierendes Protein könnte zu dieser verstärkten Beweglichkeit der Zellen beitragen (Sun et al., 1995). Wenn diese die entsprechenden proteolytischen Enzyme sezernieren, ist denkbar dass capG-transfizierte Zellen auch invasiv wachsen können. ITIH5 (bn 22) besitzt eine stabilisierende Wirkung auf die extrazelluläre Matrix (Paris et al., 2002). Beide Proteine sollten also bei Überexpression das invasive Wachstum von Zellen hemmen und damit als Tumorsuppressor wirken.

Tumorzellen zeichnen sich durch ein schnelleres und von Zell-Zell-Kontakten unabhängiges Wachstum gegenüber gesunden Zellen aus. Sie haben die Fähigkeit ihre Umgebung zu konditionieren, das heißt, selbst Wachstumsfaktoren und andere Chemokine zu sezernieren, die ihre Umgebung auf das Wachstum der Tumorzellen optimieren. Um den Einfluss von Kandidaten-Onkogenen (capG (bt 11), 14-3-3 zeta (ot 59) und FABP5 (ot 89)) auf das Wachstum von Tumorzellen zu bestätigen, wurde die komplette cDNA in den Vektor pBK-CMV Δ inseriert und in ausgewählte Mammakarzinomzelllinien transfiziert. Die transfizierten Zellen wurden auf Änderungen in der Wachstumsgeschwindigkeit (Proliferationsassay mit WST-1) und Erhöhung der Foci-Bildung (*Colony Formation Assay*) in Zellkultur untersucht. Um die Wiederherstellung einer Tumorsuppressorgenaktivität nachzuweisen, wurden die Kandidatengene ITIH5 (bn 22), Alpha-B-Crystallin (bn 39) und PIGR (pct 56) in tumorigene Zelllinien transfiziert, die vom Mammakarzinom abstammen. Hier untersuchte Kriterien für tumorsuppressive Eigenschaften waren die Verringerung der Wachstumsgeschwindigkeit und die Reduktion der Foci-Bildung in Zellkultur.

Die verwendeten Zelllinien wurden nach den Transfektionen mittels Northern-Blot auf die Expression des Transgens untersucht. Die Expression aller sechs Kandidatengene konnte nach transienter Transfektion eindeutig nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Außerdem wurde zum gleichen Zeitpunkt mittels einer durchflusszytometrischen Messung die Transfektionsrate bestimmt. Nach Kotransfektion des Kandidatengens mit EGFP in einem Verhältnis von 1 zu 10 war es möglich, anhand der Anzahl grün fluoreszierender Zellen (EGFP-Transfektanten) näherungsweise auf die Gesamtzahl transfizierter Zellen zu schließen. Es ergaben sich Transfektionsraten zwischen 50 und 70 % in den untersuchten Transfektanten (Daten nicht gezeigt). Bei einer so hohen Transfektionsrate kann man davon ausgehen, einen

Effekt auf die Zellen, der durch die transfizierten Gene verursacht wird, beobachten zu können.

Von Bedeutung für die Charakterisierung der sechs Kandidatengene war auch eine umfassende Literaturrecherche. Sie sollte dazu dienen, Daten zur Expression in anderen Tumoren zu erhalten und Verbindungen der untersuchten Proteine zu verschiedenen Signaltransduktionswegen zu finden. Diese in der Literatur gefundenen Angaben, die für das Mammakarzinom aus Zeitgründen aber nicht experimentell bestätigt werden konnten, werden in der Diskussion ausführlich besprochen.

4.2 Das Kandidatengen ITIH5 (bn 22)

Nach einem Datenbankabgleich ergaben sich für den in cDNA-Dot-Blot und Echtzeit-PCR als differentiell transkribiert gefundenen cDNA-Klon AA134750 Übereinstimmungen mit verschiedenen Datenbankeinträgen. Eine hohe Homologie (99 %) über den bekannten Bereich des cDNA-Klons war bei mehreren Einträgen für ein hypothetisches Protein MGC 10848 zu finden. Außerdem wurde ein Datenbankeintrag mit 63 % Homologie zur schweren Kette H3 des Inter-alpha-Trypsin-Inhibitor (X67055) identifiziert. Als Grundlage zur Klonierung des gesamten offenen Leserahmens von bn 22 wurde die Sequenz des Datenbankeintrags XM_043134 (MGC 10848) ausgewählt. Sie repräsentierte den längsten offenen Leserahmen (2871 bp) unter den vorhandenen Datenbankeinträgen. Anhand dieses Datenbankeintrags wurden die in Tabelle 16 und 17 beschriebenen Klonierungsprimer bestimmt. Die RT-PCR von bn 22 wurde an RNA aus Normalgewebe der Mamma durchgeführt. Das resultierende PCR-Produkt besaß eine Länge von 2829 bp. Zwei verschiedene PCR-Produkte wurden sequenziert. Beide zeigten 99 % Homologie zu XM_043134 und NM_030569.2 (neuerer Datenbankeintrag). Es wurde auch nach wiederholter RT-PCR an RNA-Präparationen aus verschiedenen Plazentaprobe und Mammanormalgeweben immer wieder der gleiche Sequenzunterschied zu den vorhandenen Datenbankeinträgen gefunden. Eine andere Basenpaarfolge ergab sich bei bp 564 (tgggcgt statt tggacgt) und bei bp 1011 (tttcca statt tttcca). Diese führen zu einem Aminosäureaustausch in der abgeleiteten Proteinsequenz an den Positionen 188 (Asp statt Gly) und 337 (Ser statt Pro). Da dieses Ergebnis durch mehrere Sequenzierungen abgesichert wurde, ist anzunehmen, dass bei den vorhandenen Datenbankeinträgen XM_043134 und NM_030569.2 Sequenzfehler vorliegen. Um das bisher unbekannte Protein näher zu charakterisieren, wurde von der mRNA-Sequenz die Aminosäuresequenz abgeleitet und mit Hilfe der Datenbank ProDom eine Analyse der Domänenstruktur durchgeführt. Das Protein besitzt eine Länge von 942 Aminosäuren.

Anhand der erhaltenen Daten lässt sich schlussfolgern, dass das vorliegende Protein ein neues Mitglied der Inter-alpha-Trypsin-Inhibitor-Familie ist (Himmelfarb et al., 2004). Laut der bestehenden Nomenklatur (Salier et al., 1996) erhält es die Bezeichnung „*inter-alpha trypsin inhibitor heavy chain precursor 5*“ (ITIH5). Die Sequenz des klonierten offenen Leserahmens wurde von uns in die Datenbank des NCBI eingetragen und erhielt die Zugriffsnummer AY238437.

Die Inter-alpha-Trypsin-Inhibitor-Familie besteht aus Proteaseinhibitoren, die sich aus zwei Vorläuferproteinen zusammensetzen (Salier et al., 1996). Sie bestehen aus einer leichten Kette, Bikunin, und einer Klasse von homologen schweren Ketten. Die Familie der schweren Ketten setzt sich aus den fünf Mitgliedern ITIH1-ITIH5 zusammen. Sie werden durch fünf verschiedene Gene (*H1-H5*) auf zwei Chromosomen kodiert. Da die cDNA-Sequenzen dieser Gene hoch homolog sind, wird davon ausgegangen, dass sie durch Genduplikationen aus einem gemeinsamen Vorläufergen entstanden sind (Chan et al., 1995). Um den Verwandtschaftsgrad von ITIH5 mit allen bekannten ITIH-Proteinen aufzuklären, wurde durch Vergleiche der familientypischen Domänen eine phylogenetische Analyse erstellt. Daraus ergibt sich, dass ITIH5 eine eigene Subfamilie bildet, die sich von einem gemeinsamen Vorläufermolekül abgeleitet hat.

Die genomische Organisation von *H5* wurde durch einen Vergleich der Sequenz des offenen Leserahmens mit der Humangenomdatenbank des NCBI analysiert und mit den Genen für die anderen schweren Ketten des Inter-alpha-Trypsin-Inhibitors verglichen. Das Gen kartiert auf Chromosom 10p15, überspannt eine Länge von 103,8 kb und besteht aus 14 Exons (Himmelfarb et al., 2004). *H2* und *H5* sind auf Chromosom 10p14 bzw. 10p15 mit einem Abstand von 36,4 kb lokalisiert (Salier et al., 1996, Himmelfarb et al., 2004). Diese Regionen auf Chromosom 10p wurden bereits mit Brustkrebs in Zusammenhang gebracht (Patel et al. 1994, James et al. 1997). Es kam laut Literatur in 80 % der Fälle zu einem Verlust der chromosomalen Region 10p15.3-p14, auf der bisher 8 Gene kartiert wurden. Die Gene *H1* und *H3* wurden auf Chromosom 3p21.1-21.2 mit einem Abstand von nur 2,7 kb als Tandemstruktur lokalisiert, *H4* kartiert auf Chromosomenabschnitt 3p14-p21.

Um Daten über die Regulation der Transkription von *H5* zu sammeln, wurde eine Analyse der potentiellen Promotorregion mit der Software MatInspector durchgeführt. Mit Hilfe der Datenbankanalysen sollten Hinweise auf die Brustepithel-spezifische Expression von ITIH5 gefunden werden. Die mögliche Promotorregion für das Gen *H5* wurde mit der Software Eldorado identifiziert. Sie erstreckt sich über 637 bp in der 5'-Region und in Exon 1 des Gens. Die Analyse der Promotorregion ergab verschiedene mögliche Bindungsstellen für

Transkriptionsfaktoren, welche an Entwicklung Differenzierung und Wachstum in verschiedenen Organsystemen beteiligt sind. Dazu gehören EGR1 (*early growth response 1*), Zinc finger/POZ domain transcription factor, Mitglieder der b-zip-Familie, KLF3 (*basic krueppel-like factor*). Die Mitglieder der nur-Proteinfamilie (nur77, nurr1, nor-1) sind an der Regulation von Entzündungsprozessen und der Steroidsynthese beteiligt. Für das Gen *H5* wurde keine TATA-Box identifiziert. Es besitzt stattdessen Bindungsstellen für das *core promoter binding protein* (CPBP), welches an der Regulation der Expression von Genen ohne TATA-Box beteiligt ist. Das entspricht den bisher publizierten Daten für die anderen Gene (Diarra-Mehrpour et al., 1998). Das Gen *H3* scheint bisher das einzige dieser Familie zu sein, für das eine typische TATA-Box beschrieben wurde. Über die vier bisher beschriebenen Mitglieder der ITIH-Familie ist bekannt, dass die Expression der Gene größtenteils auf die Leber beschränkt ist (Kobayashi et al., 1999). Es wurde in allen vier Genen der leberspezifische Verstärker „*hepatocyte nuclear factor*“ gefunden (Diarra-Mehrpour et al., 1998). Er könnte für die auf die Leber beschränkte Expression verantwortlich sein. Leberspezifische Transkriptionsfaktoren zur Regulation der Expression von *H5* konnten mit ElDorado nicht identifiziert werden. Weiterhin wurden in allen vier Genen „*CCAAT/-enhancer-binding protein*“ -Elemente detektiert, welche für eine konstitutive Expression verantwortlich sind. Aber die Verstärkerelemente unterscheiden sich in Lokalisation und Anzahl. Für das Gen *H5* wurden Bindungsstellen für MAZ (*MYC-associated zinc finger protein*) und SP1 detektiert, welche für eine Basalexpression verantwortlich sind. Außerdem konnten zwischen den 5' flankierenden Regionen der Gene *H1*, *H3* und *H4* keine signifikanten Sequenzhomologien gefunden werden (Diarra-Mehrpour et al., 1998). Diese Daten deuten auf unterschiedliche Promotorstrukturen und damit unterschiedliche Regulation der Expression auch innerhalb nahe verwandter Mitglieder der ITIH-Familie hin. Der Vergleich der Ergebnisse der eigenen Promotoranalysen und der zur Verfügung stehenden Literatur (Salier et al., 1996, Diarra-Mehrpour et al., 1998) zeigt, dass für das Gen *H5* viele allgemeine Transkriptionsfaktoren identifiziert wurden. Leberspezifische Promotorelemente wurden nicht gefunden. Die Datenbankanalysen zur Promotorregion von ITIH5 sollten zukünftig experimentell bestätigt werden. Außerdem könnte der Promotor auf eine mögliche gewebespezifische Expression hin untersucht werden.

Mittels Northern-Blot-Analysen wurde die Expression der ITIH5-mRNA in humanen Normalgeweben bestimmt. Ein Transkript von 3,2 kb konnte in verschiedenen Geweben detektiert werden (Abb. 14). Die Größe der mRNA der anderen Mitglieder der Familie differiert zwischen 2,9 und 3,3 kb (Salier et al., 1996). Die mRNA, welche vom cDNA-Klon

bn 22 abgeleitet wurde, hat nur eine Länge von 2,9 kb. Die Länge der 5'UTR wurde von der Software ELDorado mit 43 bp angegeben und die Länge der 3'UTR mit 354 bp. Das könnte den Unterschied zwischen der im Northern-Blot detektierten Bandengröße und der theoretischen Angabe zur Größe der mRNA erklären. Allerdings konnte bei einer Datenbankanalyse der vorliegenden mRNA-Sequenz kein polyA-Signal detektiert werden. Das Transkript für ITIH5 ist in den meisten der untersuchten Gewebe nur sehr schwach exprimiert. Eine deutliche Expression konnte jedoch in allen untersuchten Geweben des weiblichen Reproduktionstraktes gefunden werden. Diese war besonders stark in der Plazenta ausgeprägt. In der Literatur wurde bisher noch keine mRNA-Expression eines Mitgliedes der ITIH-Familie in Geweben des weiblichen Reproduktionstraktes beschrieben. Die publizierten Angaben beschreiben eine primäre Transkription der schweren Ketten H1 bis H4 und von Bikunin in der Leber. Die Gene *H2* und *H3* werden auch in geringem Maße im Gehirn transkribiert (Salier et al., 1996). Im Gegensatz zu diesen Daten konnte in der vorliegenden Arbeit keine Expression von ITIH5 in der Leber nachgewiesen werden. Immunhistochemisch konnte der Inter-alpha-Trypsin-Inhibitor im Synzytiotrophoblast humaner Plazenta lokalisiert werden (Castellucci et al., 1994). Die Resultate der Northern-Blot-Analysen lassen vermuten, dass die Expression von ITIH5 nicht leberspezifisch ist. Die an den Mammakarzinomzelllinien durchgeführten Echtzeit-PCRs ergaben eine schwache Expression von ITIH5 in MCF7 und MCF10a. Bei den durchgeführten RNA-RNA-*in situ*-Hybridisierungen wurde in 17 von 20 Fällen in den Lobuli und Ducti des Normalgewebes eine deutliche Expression von ITIH5 gefunden. Im hybridisierten Tumorgewebe war keine oder nur eine sehr schwache Expression zu erkennen. Das gefundene Expressionsmuster verdeutlicht die spezifische Transkription von ITIH5 in gesundem Brustepithel. Diese Daten stimmen mit den Ergebnissen der Analysen von cDNA-Dot-Blot und Echtzeit-PCR überein. Außerdem war bei der Hybridisierung eines „*human matched tumor/normal expression array*“ von Clontech in 8 von 9 Fällen die Expression in den Brusttumoren mehr als 2fach herunter reguliert (Himmelfarb et al., 2004). Diese Analyse bestätigt die in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse ebenfalls. Aufgrund der in unseren Experimenten gefundenen Widersprüche zur Literatur soll die Expression der schweren Ketten der ITIH-Familie zukünftig durch Northern-Blot-Analysen in humanen Normalgeweben und immunhistochemische Untersuchungen an verschiedenen Normal- und Tumorgeweben überprüft werden. Die Domänenstruktur von ITIH5 wurde mit Hilfe von Datenbankanalysen (ProDom) aufgeklärt. Das Protein besitzt eine „*vault protein inter-alpha-trypsin*“ (VIT)-Domäne (AS 44-161), und eine „*vonWillebrand factor type A*“ (vWA) Domäne (AS 295-478)

(Himmelfarb et al., 2004). Diese beiden Domänen liegen in allen schweren Ketten des Inter-alpha-Trypsin-Inhibitors konserviert vor. Die VIT-Domäne kommt nur in Mitgliedern der ITIH-Familie vor, sie kann also als ein charakteristisches Merkmal dieser Familie angesehen werden. Die Struktur dieser Domäne konnte bisher noch nicht geklärt werden. Die vWA-Domäne ist im humanen Genom weit verbreitet. Sie ist für die Bindung an Integrine, Kollagene, Proteoglykane und Heparin (Colombatti & Bonaldo, 1991) verantwortlich. Diese Domäne vermittelt die Adhäsion von extrazellulären eukaryontischen Proteinen über Metallionen-abhängige Adhäsionsstellen (MIDAS). Sie wurde aber auch in intrazellulären Proteinen gefunden. ITIH5 ist weiterhin durch ein Signalpeptid (Aminosäuren 1-18) am N-Terminus und eine konservierte Spaltstelle (DPHFVV) im C-terminalen Bereich charakterisiert. Die anschließende C-terminale Region beinhaltet eine „*multicopper oxidase*“ Domäne (Aminosäuren 678-928). Die Funktion dieses, bei der Prozessierung des Inter-alpha-Trypsin-Inhibitors abgespaltenen, Fragments ist bisher noch ungeklärt. In Abbildung 23 sind die genomische Organisation von *H5*, die Struktur der mRNA (3,2 kb) und die Domänenstruktur des Proteins (942 AS) zusammengefasst.

Daten zur Prozessierung der Proteine der ITIH-Familie konnten der Literatur (Salier et al., 1996) entnommen werden. Diese Angaben beschränken sich jedoch auf die Expression der Proteine in der Leber. Alle schweren Ketten, außer ITIH4, werden als Polypeptidvorläufer synthetisiert und posttranslational prozessiert. ITIH1, -2 und -3 werden an der konservierten C-terminalen Spaltstelle verkürzt und bilden dann über eine Chondroitin-4-Sulfat-Kette kovalente Bindungen zu Bikunin (ITI leichte Kette) aus. Auch ITIH5 besitzt diese C-terminale Spaltstelle und bindet wahrscheinlich an Bikunin. Durch die fehlende Spaltstelle in ITIH4 kann dieses nicht an Bikunin binden. Der zuerst identifizierte Inter-alpha-Trypsin-Inhibitor, bestehend aus Bikunin, kovalent gebunden an ITIH1 und ITIH2, wurde als Serinproteinaseinhibitor in hohen Konzentrationen in humanem Plasma gefunden. Auch die anderen Proteine werden nach der Prozessierung, gebunden an Bikunin, ins Plasma abgegeben (Chen et al., 1992). Über das Blut werden sie in alle Gewebe verteilt. Die schweren Ketten des Inter-alpha-Trypsin-Inhibitors wurden bei immunhistochemischen Untersuchungen als diffuse zytoplasmatische Färbung mit ubiquitärer Verteilung gefunden (Kobayashi et al., 1995). Nach der Spaltung von Bikunin können die schweren Ketten kovalent an Hyaluronsäure binden und dienen als Stabilisatoren der extrazellulären Matrix. Kolokalisationen von schweren Ketten und Hyaluronsäure wurden nur im Ovar, in den Thekazellen und Stromazellen um reife Follikel und im Knorpelgewebe gefunden (Kobayashi et al., 1995). Von Chen und Kollegen wurden 1992 Studien zur Beteiligung von

Familienmitgliedern des Inter-alpha-Trypsin-Inhibitors an der Reifung von Oozyten durchgeführt. Sie stellten fest, dass vor der Ovulation die Kumuluszellen des Kumulus-Oozytenkomplexes Hyaluronsäure-angereicherte extrazelluläre Matrix sekretieren und dissoziieren. Die in der extrazellulären Matrix enthaltenen schweren Ketten des Inter-alpha-Trypsin-Inhibitors schränken die Expansion des Kumulus-Oozyten-Komplexes ein. Sie stabilisieren also die extrazelluläre Matrix. Die Arbeitsgruppe konnte außerdem nachweisen, dass die beteiligten schweren Ketten des ITI aus dem Blut stammen. Auch bei Entzündungsprozessen spielen die ITI-Proteine eine Rolle (Salier et al., 1996). Der Komplex aus Hyaluronsäure und den schweren Ketten ITIH1 und ITIH2 wurde in der Gelenkflüssigkeit von Patienten mit rheumatoider Arthritis gefunden. Bei rheumatoider Arthritis kommt das TSG-6-Glycoprotein (*tumor necrosis factor stimulated gene 6*) in hohen Konzentrationen in der Gelenkflüssigkeit vor. Es kann Komplexe mit dem Inter-alpha-Trypsin-Inhibitor bilden und damit die Plasmin-inhibitorische Funktion von Bikunin verstärken. Damit würde dieser Proteinkomplex Plasmin, einen wichtigen Aktivator von entzündungsassoziierten Enzymkaskaden, hemmen.

Da wir die Expression von ITIH5 im Brustepithel auf mRNA-Ebene eindeutig nachweisen konnten, wäre es interessant zu wissen, ob Bikunin in diesem Gewebetyp ebenfalls exprimiert wird. Die Koexpression würde Rückschlüsse auf eine mögliche Bindung der Proteine nach der Prozessierung zulassen. Ohne Expression von Bikunin wäre es vorstellbar, dass ITIH5 nicht ans Blut abgegeben und im Körper verteilt wird. Es könnte sofort aus den Epithelzellen in die umgebende extrazelluläre Matrix ausgeschleust werden und dort an Hyaluronsäure binden. Damit wäre die Funktion von ITIH5 auf die Stabilisierung der extrazellulären Matrix im Drüsengewebe der Brust beschränkt.

ITIH-Proteine spielen durch ihre Proteinaseinhibitorfunktion (vermittelt durch Bikunin) und ihre Fähigkeit, an die Hauptkomponente der extrazellulären Matrix, Hyaluronsäure, zu binden (vermittelt durch die schweren Ketten) möglicherweise eine Rolle bei der Zellmigration und Invasivität von Tumoren. Bisher konnte von Paris und Kollegen (2002) gezeigt werden, dass eine Überexpression von Mitgliedern der ITIH-Familie zur Inhibierung der Tumorentwicklung und/oder Ausbreitung von Metastasen führt. Die Überexpression von Bikunin führt zu einer dramatischen Abnahme des Gewichts von Primärtumoren und der Anzahl von Metastasen in Mausmodellen für Lungenkrebs. Das kann durch die Hemmung von Plasmin durch Bikunin erklärt werden (Bost et al., 1998). Wenn Plasmin inhibiert wird, sinkt die Degradation der extrazellulären Matrix dramatisch und die Tumorzellinvasion wird gestoppt. Die Überexpression von ITIH1 und ITIH3 induziert ebenfalls eine Abnahme der Metastasen-

anzahl in den Mausmodellen, hatte aber keinen Einfluss auf das Wachstum des Primärtumors. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass die schweren Ketten mit einem Schritt des metastatischen Prozesses interferieren. Außerdem zeigten in vitro-Experimente, dass Expression von ITIH1 und ITIH3 die Zelladhäsion verstärkt (Paris et al., 2002), was mit dem antimetastatischen Effekt in Verbindung stehen könnte. Diese Ergebnisse lassen sich durch die stärkere Vernetzung der extrazellulären Matrix über die schweren Ketten erklären.

Aufgrund der verschiedenen Expressionsanalysen für ITIH5 lässt sich belegen, dass die Expression dieses Gens in duktalem Mammakarzinomen im Vergleich zu Normalgewebe sehr stark verringert ist. Diese Ergebnisse würden für ein potentiell Tumorsuppressorgen sprechen. Ob es sich bei dem gefundenen Gen um ein an der Entstehung und/oder Progression von Tumoren beteiligtes Gen handeln könnte, sollten die folgenden funktionellen Untersuchungen zeigen. Da in der Literatur für andere Mitglieder der ITIH-Familie bei Überexpression eine Reduktion der Metastasenzahl im Mausmodell beschrieben wurde (Paris et al., 2002), sollte in einer in vitro-Analyse zur Invasivität von ITIH5-transfizierten invasiv wachsenden Zelllinien eine Änderung des Invasionsverhaltens nachgewiesen werden. Bei der Auswertung der vorliegenden Experimente ließ sich jedoch keine Veränderung in der Invasivität der ITIH5-transfizierten Zellen im Vergleich zu den mit dem Leervektor transfizierten Zellen nachweisen. Die Transfektion mit dem Leervektor allein bewirkte bereits eine Aufhebung des invasiven Wachstums der Zelllinien MFM 223 und SKB-R3. Möglicherweise sind die verwendeten Zelllinien für dieses Experiment ungeeignet. Außerdem wurde in einer Proliferationsanalyse der Einfluss von ITIH5 auf die Wachstumsgeschwindigkeit verschiedener Zelllinien untersucht. Hier konnte festgestellt werden, dass in zwei der drei untersuchten Zelllinien (EFM 19 und MFM 223) eine verringerte Wachstumsgeschwindigkeit vorlag. Eine geringere Proliferationsgeschwindigkeit könnte man auf eine stärkere interzelluläre Verbindung zurückführen, die durch die engeren Zell-Zell-Kontakte zu proliferationshemmenden Signalen zwischen den Zellen führt. Die Reduktion der Wachstumsgeschwindigkeit von ITIH5-exprimierenden Mammakarzinomzellen könnte ein weiterer Hinweis auf die Beteiligung von ITIH5 an der Hemmung der Entwicklung und/oder Progression von Tumoren sein. Anhand der erhaltenen Ergebnisse ist es vorstellbar, dass der Verlust von ITIH5 eine ähnliche Funktion wie der Verlust von ITIH1 und ITIH3 in der Tumorgenese hat und die Metastasierung von invasiven Tumortypen erleichtert. Zur tiefer gehenden Analyse der Funktion bei der Metastasierung könnten der Invasionsassay und ein Zelladhäsionsassay für weitere Mammakarzinomzelllinien und etablierte Normalgewebezelllinien durchgeführt werden. Weiterhin sollen auch in vivo-Experimente an Mausmodellen

für Mammakarzinome durchgeführt werden. Zusätzlich könnte eine Analyse der VIT-Domäne Aufschluss über mögliche bindende Proteine und Signaltransduktionswege, an denen ITIH5 beteiligt ist, geben. Das liefert möglicherweise Hinweise zu weiteren Funktionen des Proteins innerhalb der extrazellulären Matrix und seiner Rolle in der Tumormetastasierung. Nach genauerer Analyse der Expression von ITIH5 in einer Vielzahl von gut dokumentierten metastasierenden und nichtmetastasierenden duktalen Mammakarzinomen wäre es möglich, diesem Protein eine Rolle als prognostischem Marker einzuräumen.

4.3 Das Kandidatengen Alpha-B-Crystallin (bn 39)

Nach einem Abgleich mit der Datenbank des NCBI ergaben sich für den cDNA-Klon H39889 100%ige Übereinstimmungen mit verschiedenen Einträgen für Alpha-B-Crystallin. Anhand des Datenbankeintrags XM_006294 wurden die in Tabelle 16 und 17 beschriebenen Klonierungsprimer ausgewählt. Die RT-PCR wurde an RNA aus Mamma-Normalgewebe durchgeführt. Das resultierende PCR-Produkt hatte eine Länge von 528 bp. Der sequenzierte Klon zeigte 100 % Homologie zu NM_001885.1, welches ebenfalls für Alpha-B-Crystallin kodiert (alter Datenbankeintrag XM_006294 wurde ersetzt). Das identifizierte Protein gehört zur HSP20/Alpha-Crystallin-Familie (Derham & Harding, 1999). Diese Hitzeschockproteinfamilie ist durch eine hydrophobe N-terminale Domäne (HSP20-Domäne, AS 1-63, Exon 1) mit hoher Homologie zu kleinen Hitzeschockproteinen charakterisiert. Die HSP20-Domäne ist an der Aggregation der Untereinheiten zu Alpha-Crystallin beteiligt. An diesen Bereich schließt sich eine kurze variable Region (AS 64-105, Exon 2) an. Außerdem besitzt Alpha-B-Crystallin eine hoch konservierte C-terminale Domäne (Alpha-Crystallin-Domäne, AS 106-175, Exon 3). Diese stark geladene Region des Proteins ist für die Löslichkeit der Aggregate verantwortlich und reagiert mit ungefalteten Proteinen über hydrophobe Interaktionen (Derham & Harding, 1999, NCBI DART). Am C-Terminus von Alpha-B-Crystallin befindet sich eine variable Sequenz von 10 Aminosäuren, die nur gering konserviert ist. Wird diese Region in rekombinanten Proteinen entfernt, sinken die Chaperon-Funktion des Proteins und die Integrität der Tertiärstruktur. Außerdem wird die Löslichkeit sehr stark reduziert. Es besteht die Möglichkeit, dass die Verkürzung des C-Terminus in einigen Geweben eine posttranslationale Modifikation, abhängig von der Funktion des Proteins, darstellt (Derham & Harding, 1999). Ein weiteres Mitglied dieser Proteinfamilie ist Alpha-A-Crystallin mit 55 % Aminosäurehomologie zu Alpha-B-Crystallin.

Alpha-B-Crystallin wird durch drei Exons kodiert, welche 3,1 kb auf Chromosom 11q22.3-23.1 überspannen (Ngo et al., 1989, Jeanpierre et al., 1993). Es ist bekannt, dass LOH auf 11q mit Tumorgröße und Progression korreliert (Kamik et al., 1998; Lichy et al., 1998).

Über die Regulation der Transkription von Alpha-B-Crystallin gibt es in der Literatur bereits Daten. Es ist bekannt, dass Alpha-B-Crystallin durch Signale aus der Umwelt und entwicklungsspezifische Signale induzierbar ist (Derham & Harding, 1999). Der Promotor ermöglicht die konstitutive Expression in vielen Geweben. Es wurden zwei verschiedene mRNA-Varianten beschrieben, die kürzere ist durch Stress induzierbar. Die Expression wird durch ein Hitzeschockelement, ein muskelspezifisches regulatorisches Element (E-Box-Motiv) und ein Glucokortikoid-Antwortelement im Promotor des Gens induziert (Gopal-Srivastava et al., 1995). Außerdem wurden verschiedene Transkriptionsfaktorbindungsstellen für den Nekrose-Faktor- κ B, das Interleukin-6-Antwortelement-Bindeprotein und das Stimulatorische Protein 1 identifiziert. Die Alpha-B-Crystallin-Expression im humanen Endometrium wird durch Steroidhormone reguliert. In der vorliegenden Literatur konnten jedoch keine Angaben zu einer spezifischen Regulation des längeren Transkripts gefunden werden. Um weitere Daten über die Regulation der Transkription von Alpha-B-Crystallin zu erhalten, wurde eine Analyse der potentiellen Promotorregion mit der Software MatInspector durchgeführt. Die Promotorregion wurde mit der Software ElDorado identifiziert. Sie erstreckt sich über 1173 bp in der 5'-Region und Exon 1 des Gens. Die Analyse der Promotorregion ergab verschiedene mögliche Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren. Dazu gehören Transkriptionsfaktoren die für die Embryonalentwicklung, Entwicklung des Zentralnervensystems, des hämatopoetischen Systems, des Immunsystems und die Entwicklung der Geschlechtsorgane verantwortlich sind. Außerdem wurden Transkriptionsfaktoren gefunden, welche Transport und Metabolismus von Glukose und Lipiden regulieren. Zusätzlich wurden leberspezifische Transkriptionsfaktoren identifiziert, die den Medikament- und Steroidmetabolismus aktivieren. Außerdem wurde eine TATA-Box identifiziert (gtttaTAAaataaaaat).

Die mRNA für Alpha-B-Crystallin wird bei Säugetieren in vielen Geweben exprimiert. Es wurden zwei verschiedene mRNA-Varianten beschrieben, die durch alternatives Spleißen eines zusätzlichen Exons entstehen. Dabei kommt es zu einer Insertion im verbindenden Segment zwischen den Aminosäureresten 63 und 64 an der Verknüpfung zwischen der N-terminalen Domäne und der zentralen Domäne (Derham & Harding, 1999). Die kürzere mRNA wurde in Augenlinsen, dem Herzen, Skelettmuskeln und der Niere gefunden. In diesen Geweben ist die mRNA stark exprimiert. Das längere Transkript wurde in Geweben

mit niedrigerer Expression wie der Lunge und dem Gehirn gefunden (Tamm et al., 1996). Iwaki und Kollegen (1989) haben die Expression von Alpha-B-Crystallin in Geweben der Ratte und in humanen Glioblastomzelllinien mittels Northern-Blot untersucht. Die kürzere mRNA wurde hier mit einer Transkriptgröße von 0,8-0,9 kb und das größere Spleißprodukt mit einer Länge von 1,1 kb beschrieben. Alpha-A-Crystallin dagegen hybridisiert mit einer Bande von 1,5 kb. Für Alpha-B-Crystallin konnten leider keine Northern-Blots von humanen Normalgeweben angefertigt werden. Die an den Mammakarzinomzelllinien durchgeführten Echtzeit-PCRs ergaben in keiner der untersuchten Zelllinien eine Expression von Alpha-B-Crystallin. Bei den durchgeführten RNA-RNA-*in situ*-Hybridisierungen wurde in den untersuchten Normalgeweben in 18 von 20 Fällen in den Lobuli und Ducti eine deutlich positive Expression von Alpha-B-Crystallin gefunden. Im Großteil der hybridisierten Tumorgewebe wurden keine Hybridisierungssignale detektiert. Allerdings war in sechs der 19 untersuchten Tumorgewebe eine fokal positive Expression zu erkennen. Die Hybridisierungssignale wurden dabei nicht abhängig vom Tumortyp oder -grad gefunden. Es kam in invasiv duktalem Karzinomen des Grades II und III, in einem invasiv lobulären und einem metaplastischen Karzinom zu einer positiven Reaktion. Allerdings lässt sich anhand des in der RNA-RNA-*in situ*-Hybridisierung gefundenen Expressionsmusters die spezifische Transkription von Alpha-B-Crystallin in gesundem Drüsenepithel der Mamma nachweisen. Die für die RNA-Expression in der RNA-RNA-*in situ*-Hybridisierung erhaltenen Daten stimmen mit den Ergebnissen aus den Quantifizierungsexperimenten sehr gut überein. Auch die Ergebnisse der Hybridisierung eines „*human matched tumor/normal expression array*“ von Clontech ergaben eine 72%ige Herunterregulation der Expression von Alpha-B-Crystallin in den Mammakarzinomproben gegenüber Normalgewebeproben (Dahl et al., 2005). Außerdem zeigte sich eine 77%ige Herunterregulation bei Echtzeit-PCR-Analysen (Taqman). Zur Bestätigung der Analysen auf mRNA-Ebene wurden mit einem kommerziellen Antikörper immunhistochemische Untersuchungen an Gewebeschnitten von Tumor- und Normalgeweben der Mamma durchgeführt. Es konnten in allen Proben allerdings nur unspezifische Signale detektiert werden.

Die Funktion der Alpha-Crystalline besteht in ihrer chaperonähnlichen Aktivität. Die Aufgabe von Chaperonen liegt in der Prävention von unkorrekten Assoziationen und Aggregationen ungefalteter Polypeptidketten. Sie erkennen ungefaltete oder teilweise denaturierte Proteine und ihre hydrophoben Oberflächen, welche bei vielen zellulären Prozessen wie Proteinsynthese und -transport vorkommen. Alpha-B-Crystallin bildet zusammen mit Alpha-A-Crystallin ein großes Proteinaggregat aus ungefähr 40 Untereinheiten mit einer mittleren

Masse von 800 kDa. Die Homoaggregate von Alpha-A-Crystallin und Alpha-B-Crystallin haben Molekülmassen von 600 kDa und 450 kDa (Datta & Rao, 2000). Alpha-Crystalline besitzen durch ihre dynamische Quartärstruktur einen hohen Grad an Flexibilität. Diese kommt dadurch zustande, dass die Proteinaggregate Untereinheiten beliebig untereinander austauschen können. Die hohe Dynamik ist notwendig, um möglichst viele verschiedene Proteinfaltungsintermediate binden zu können. Die gebildeten Aggregate werden durch selbstkomplementäre Motive, die über geladene Reste Salz- oder Wasserstoffbrückenbindungen und über nichtpolare Reste hydrophobe Interaktionen ausbilden, in den Untereinheiten stabilisiert (Farnsworth and Sing, 2000). Die chaperonähnliche Aktivität der Alpha-Crystalline kommt durch die Exposition von hydrophoben Oberflächen zustande. Eine wichtige Funktion der Alpha-Crystalline besteht in der Aufrechterhaltung von Transparenz und Refraktion von Augenlinsen. Ein Großteil des Inneren der Linse besteht aus Aggregaten von Alpha-A-Crystallin und Alpha-B-Crystallin. Alpha-B-Crystallin besitzt als Chaperon eine bedeutende Funktion im Schutz der zellulären Integrität vor stressbedingten Schädigungen. Dies konnte in verschiedenen Studien gezeigt werden. Zum Beispiel schützt Alpha-B-Crystallin die zelluläre Struktur durch Aggregation mit den intermediären Filamenten, einer Hauptkomponente des eukaryontischen Zytoskeletts in Zytoplasma und an der nukleären Lamina (Djabali et al., 1997). In den Herzmuskelzellen oder in Skelettmuskeln interagiert Alpha-B-Crystallin mit Aktin-, β -Tubulin- und Desmin-Filamenten (Derham & Harding, 1999). Es wurden viele in vitro-Untersuchungen zur Beteiligung von Alpha-B-Crystallin an entsprechenden Signaltransduktionswegen durchgeführt. Ein möglicher Signaltransduktionsweg zur verstärkten Transkription von Alpha-B-Crystallin unter Stress wurde von Hoover und Mitarbeitern (2000) in Herzmuskelzellen aufgeklärt. Die Aktivierung der MAPK (mitogen aktivierten Proteinkinase) -Kinase MKK6 durch Stress wie Ischämie (Minderdurchblutung eines Gewebes) führt zu einer p38 (MAPK) -abhängigen Zunahme der Transkription von Alpha-B-Crystallin. Außerdem aktiviert p38 die MAPKAP-K2 (MAPK-aktivierte Proteinkinase 2), was zu einer Phosphorylierung von Alpha-B-Crystallin an Ser-59 führt. Die phosphorylierte Form wandert aus dem Zytosol an die Z-Scheiben der Sarkomere und stabilisiert diese. Des Weiteren existieren Hinweise darauf, dass die Expression von Alpha-B-Crystallin bei Stress durch erhöhte metabolische Aktivität der Arachidonsäurekaskade verstärkt wird (Derham & Harding, 1999). Ceramid, ein Sekundärbotenstoff, der Zelldifferenzierung und Apoptose vermittelt, induziert in NIH3T3-Fibroblasten die Expression von Alpha-B-Crystallin. Zusätzlich zum Schutz der zellulären Integrität vor Stress wurde eine Rolle in der Vermittlung von Apoptose in Muskelzellen spekuliert (Kamradt et al.,

2001). Alpha-B-Crystallin inhibiert den mitochondrialen und den „Todesrezeptor-Signalweg“. Dazu bindet es an die durch Kaspase-8 und -9 teilweise prozessierte Kaspase-3 und verhindert ihre autokatalytische Aktivierung.

Die durchgeführten Validierungsexperimente bestätigen die im Vorfeld theoretisch ermittelten Daten zur Expression von Alpha-B-Crystallin. Man kann zusammenfassen, dass die Transkription dieses Gens in dukalen Mammakarzinomen im Vergleich zu Normalgewebe stark herunter reguliert ist. Diese Ergebnisse würden in Zusammenhang mit der Rolle von Alpha-B-Crystallin als Inhibitor der Apoptose (Kamradt et al., 2001) einen Hinweis auf seine Funktion als Tumorsuppressorgen geben. Diese Ergebnisse widersprechen allerdings den in der Literatur vorhandenen Daten. Eine hohe Expression von Alpha-B-Crystallin in stark proliferierenden Tumorzellen *in vivo* und *in vitro* wurde von verschiedenen Arbeitsgruppen beobachtet. So akkumuliert Alpha-B-Crystallin in NIH3T3-Fibroblasten nach Expression der Onkogene H-ras und v-mos (Klemenz et al., 1991). In Geweben und Zellkulturen von Retinoblastomen und glialen Tumoren wie Astrozytomen und Glioblastomen (Derham & Harding, 1999) wurde eine verstärkte Expression von Alpha-B-Crystallin detektiert. Es konnte bisher nicht nachgewiesen werden, ob die verstärkte Expression von Alpha-B-Crystallin in den erwähnten Tumorzellen zur Stabilisierung von intermediären Filamenten des Zytoskeletts oder zytoplasmatischen Proteinen dient, oder ob sie mit dem allgemeinen onkogenen Stress in diesen Zellen einhergeht. Die Stabilisierung des Zytoskeletts durch Alpha-B-Crystallin könnte in schnell wachsenden Tumorzellen durchaus relevant sein, da gezeigt werden konnte, dass der Schutz des Zytoskeletts auch bei Entwicklungsprozessen eine Rolle spielt (Kato et al., 1996).

Um zu untersuchen, ob es sich bei dem gefundenen Gen tatsächlich um ein an der Entwicklung und/oder Progression von Tumoren beteiligtes Gen handelt, wurden einige funktionelle Untersuchungen durchgeführt. Zum einen sollte in einer *in vitro*-Analyse zur Proliferation von Alpha-B-Crystallin-transfizierten Mammakarzinomzelllinien eine Verringerung des Wachstums der Zellen nachgewiesen werden. Bei der Auswertung dieses Experimentes konnte festgestellt werden, dass in zwei von fünf untersuchten Zelllinien (EFM-19 und MFM 223) eine veränderte Wachstumsgeschwindigkeit vorlag. Während EFM-19 nach Transfektion mit Alpha-B-Crystallin eine geringere Wachstumsgeschwindigkeit zeigte, wurde in MFM 223 eine höhere Wachstumsrate detektiert. Da beide Zelllinien aus einem Pleuraerguß eines dukalen Mammakarzinoms Grad 3 stammen, können Art und Stadium des Tumors keinen Hinweis auf die mögliche Bedeutung des unterschiedlichen Verhaltens geben. Hinweise auf Veränderungen an Signalkaskaden, an

denen Alpha-B-Crystallin beteiligt ist, gibt es für beide Zelllinien nicht. Ebenfalls widersprüchliche Ergebnisse ergaben die Analysen zur Koloniebildung. In den vier Zelllinien BT 474, KS wt, MCF 7 und MFM 223 wurde eine geringere Anzahl ausgewachsener Kolonien und in den drei Zelllinien EFM 19, MCF10a und SKB-R3 vermehrte Koloniebildung gefunden. Ursachen für diese Differenzen liegen sicher im genetischen Hintergrund der unterschiedlichen Zelllinien. Mehr Kolonien können auswachsen, wenn die Einzelzelle am Untergrund gut anwachsen und ihr Medium mit Wachstumsfaktoren konditionieren kann. Die Hemmung von apoptotischen Signaltransduktionswegen durch Alpha-B-Crystallin (Kamradt et al., 2001) könnte in den transfizierten Zelllinien das Zellwachstum verbessern. Das würde die höhere Wachstumsrate in MFM 223 und die vermehrte Koloniebildung in den drei Zelllinien EFM 19, MCF10a und SKB-R3 erklären.

Die funktionellen Analysen konnten die Ergebnisse der Validierungsexperimente nicht bestätigen, da die funktionellen Tests nur widersprüchliche Resultate lieferten. Mit Hilfe von immunhistochemischen Untersuchungen an Normalgewebe der Mamma könnten Verbindungen von Alpha-B-Crystallin zum Zytoskelett und apoptotischen Signaltransduktionswegen nachgewiesen werden. Um Auswirkungen der zytoskelettstabilisierenden Funktion von Alpha-B-Crystallin zu untersuchen, könnten ein Adhäsions- und Invasionstest durchgeführt werden. Sollte Alpha-B-Crystallin tatsächlich das Zytoskelett stabilisieren, dann würde eine verstärkte Adhäsion auftreten und invasive Zelllinien weniger invasiv wachsen. Es wäre zu klären, ob aufgrund spezifischer Regulationsmechanismen die Transkription im Mammakarzinom herunter reguliert und in anderen Tumoren herauf reguliert wird. Darüber könnten detaillierte Promotoranalysen Aufschluss geben. Die Daten der Validierung auf mRNA-Ebene sollten durch immunhistochemische Untersuchungen auf Proteinebene bestätigt werden.

4.4 Das Kandidatengen PIGR (pct 56)

Nach einem Datenbankabgleich ergaben sich für die untersuchten cDNA-Klone H24673, AI697470 und W78778 100%ige Übereinstimmungen mit dem kodierenden Bereich des Datenbankeintrags XM_052014: „*Homo sapiens polymeric immunoglobulin receptor (PIGR) mRNA*“. Eine alternative Bezeichnung für das vorliegende Protein ist „*transmembrane secretory component*“. Zur Klonierung des gesamten offenen Leserahmens von PIGR (pct 56) wurden anhand des Datenbankeintrags XM_052014 die in Tabelle 16 und 17 beschriebenen Klonierungsprimer ausgewählt. Die Klonierung wurde an RNA aus Mamma Normalgewebe durchgeführt. Das resultierende PCR-Produkt hatte eine Länge von 2295 bp. Der sequenzierte

Klon zeigte 100 % Homologie zu XM_052014. Dieser Datenbankeintrag wurde inzwischen durch den Eintrag mit der Zugriffsnummer NM_002644 ersetzt.

Das Gen für PIGR wird durch 11 Exons auf Chromosom 1q31-q41 kodiert. Es überspannt einen Bereich von 17,9 kb. Einige andere immunologisch bedeutende Gene lokalisieren ebenfalls in der distalen Region von Chromosom 1q (Davidson et al., 1988). Ein Verlust dieser Region bei bestimmten Krankheiten konnte bisher nicht nachgewiesen werden, wahrscheinlich weil aufgrund der Bedeutung der Gene sich ein Embryo nicht entwickeln würde (Krajči et al., 1991). Untersuchungen zur Promotorstruktur des Gens für PIGR ergaben verschiedene Regulationsmechanismen (Solorzano-Vargas et al., 2002, Piskurich et al., 1993, Takenouchi-Ohkubo et al., 2000, Sarkar et al., 1998). Zum einen findet eine Basalexpression des Rezeptors statt, zum anderen kann die Expression durch zytokinspezifische Verstärkerelemente gesteuert werden. Eine Bedeutung der Steuerung durch Zytokine kommt der Reaktion auf entzündliche Prozesse zu. Außerdem wurden Transkriptionsfaktoren identifiziert, die die Expression von PIGR während der Embryonalentwicklung und der Entwicklung und Differenzierung verschiedener Organsysteme steuern (ElDorado). Eine E-Box für die basale Expression befindet sich im Bereich von nt -66 bis -71. An diese E-Box binden der „*upstream stimulatory factor*“ (USF) und andere Helix-Loop-Helix-Leuzin-Zipper-Transkriptionsfaktoren. Eine Induktion der Synthese der mRNA von PIGR durch Interferon- γ (IFN- γ), Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) und Interleukin-4 (IL-4) über verschiedene Verstärker konnte gezeigt werden. Die Stimulation der Expression des Gens für PIGR durch IFN- γ wird über eine ISRE-Region (*IFN-stimulated response element*) im 5'-Bereich (nt -128 bis -138) und Exon 1 (Bindestelle für *interferon-regulated factor-1*) reguliert (Piskurich et al., 1993). Die Stimulation der Genexpression durch TNF- α wird über ein κ B2-Element, an das NF- κ B bindet, in Intron 1 reguliert (Takenouchi-Ohkubo et al., 2000). In dieser Region befindet sich auch eine STAT-6-Bindungsstelle, die über IL-4 aktiviert werden kann. Außerdem wurde eine Bindungsstelle für den nuklearen Retinolsäurerezeptor (RAR) identifiziert (Sarkar et al., 1998). Damit wurde gezeigt, dass Retinolsäure (RA), ein Metabolit von Vitamin A, die Genexpression von PIGR regulieren kann. Außer den beschriebenen Verstärkerelementen wurden zwischen nt -372 und -83 auch Repressorelemente gefunden. Die TATA-Box liegt bei Nukleotid -27 bis -23. Die mRNA enthält sehr lange 3'- (180 bp) und 5'- (443 bp) untranslatierte Regionen. Diese weisen darauf hin, dass weitere regulatorische Elemente, die die Stabilität oder Translationsrate der mRNA regulieren, vorhanden sind (Piskurich et al., 1993).

Zur Untersuchung der Transkription von PIGR in humanen Normalgeweben wurde der „*Human MTN Blot*“ mit dem kompletten offenen Leserahmen hybridisiert. Es konnte eine singuläre Bande mit einer Größe von 4,4 kb detektiert werden. Hybridisierungssignale wurden in den aufgetragenen RNA-Extrakten von Lunge, Leber, Pankreas und Niere gefunden. Signale fehlten in den Proben von Herz, Hirn, Plazenta und Muskel. In der Literatur wurde ein Hybridisierungssignal mit einer Größe von 4,4 kb beschrieben (Sarkar et al., 1998). Von einer anderen Arbeitsgruppe (Krajči et al., 1989) wurden weitere Northern-Blot-Analysen verschiedener humaner Gewebe durchgeführt. Sie detektierten Transkripte von PIGR mit einer Größe von 3,8 kb in verschiedenen Bereichen des Darms und der Niere (starke Signale) und in Pankreas, Lunge und Endometrium (mittlere Signale). Hybridisierungssignale fehlten in Leber, Milz, Prostata, Myometrium und im Nebenhodenkopf. Diese Ergebnisse stimmen mit immunhistochemischen Lokalisationen überein. Im Widerspruch zu diesen Angaben aus der Literatur stehen die auf dem „*Human MTN Blot*“ detektierten Signale in der Leber. Die an den Mammakarzinomzelllinien durchgeführten Echtzeit-PCRs ergaben in der Zelllinie BT 474 eine deutliche Expression von PIGR. Alle weiteren sechs untersuchten Brustkrebszelllinien wiesen keine Hybridisierungssignale auf. Bei den durchgeführten RNA-RNA-*in situ*-Hybridisierungen wurde in den untersuchten Normalgeweben in allen 16 Fällen in den Lobuli und Ducti eine sehr stark positive Expression des PIGR gefunden. Diese beschränkte sich auf die unmittelbar an das Lumen grenzenden Drüsenzellen. Außerdem war in 12 der 18 untersuchten Tumorgewebe eine fokal positive Expression um ein im Gewebsverband vorhandenes Lumen zu erkennen. Durchgängige Tumorinseln hybridisierten nicht oder nur sehr schwach an einzelnen Zellen. Bei den weiteren sechs der 18 hybridisierten Tumorgewebe wurden keine Hybridisierungssignale detektiert. Die Tumorproben mit einer positiven Reaktion setzen sich aus invasiv duktalem Karzinomen verschiedenen Grades und einem invasiv lobulärem Karzinom zusammen. Anhand des in der RNA-RNA-*in situ*-Hybridisierung gefundenen Expressionsmusters lässt sich die spezifische Transkription von PIGR in gesundem Drüsenepithel der Mamma nachweisen. Die in den RNA-RNA-*in situ*-Hybridisierungen erhaltenen RNA-Expression-Daten stimmen mit den Ergebnissen aus den Quantifizierungsexperimenten sehr gut überein. Auch die Ergebnisse der Hybridisierung eines „*human matched tumor/normal expression array*“ ergaben eine 91%ige Herunterregulation der Expression des polymeren Immunglobulinrezeptors in den Mammakarzinomproben gegenüber Normalgewebeproben (Dahl et al., 2005). Zur Bestätigung der Analysen auf mRNA-Ebene wurden mit dem kommerziellen Antikörper NCL-SCO5 immunhistochemische Untersuchungen an Gewebeschnitten von Tumor- und Normalgeweben der Mamma

durchgeführt. Sie ergaben in den analysierten Normalgeweben für PIGR eine sehr stark positive Antikörperreaktion innerhalb der Drüsenzellen. Das Bindegewebe und Fettgewebe wies kein PIGR auf. Im untersuchten Tumorgewebe sind einige Tumorareale schwach positiv. Allerdings war in einigen Zellen des Tumorverbandes auch eine stark positive Reaktion zu erkennen. Dadurch ergibt sich ein heterogenes Expressionsbild von PIGR. Es lässt sich jedoch zusammenfassend sagen, dass insgesamt stärkere Signale in den Normalgeweben zu beobachten waren. Damit bestätigen die Ergebnisse der Untersuchungen zur Proteinexpression von PIGR alle bisherigen Daten zur Transkription.

Das untersuchte Protein gehört aufgrund seiner Domänenstruktur in die Immunglobulin-Superfamilie (Luton et al., 1998). Der polymere Immunglobulinrezeptor besitzt in der N-terminalen extrazellulären Region fünf Domänen, welche Homologien zu verschiedenen variablen Regionen von Immunglobulinen aufweisen. Die sechste Domäne, die Transmembrandomäne (AS 558-590), beginnt wieder mit einer signifikanten Homologie zu Immunglobulinen, geht dann aber in ein stark hydrophobes Segment über. Daran schließt sich die siebente Domäne, der zytoplasmatische Teil an. Er besteht aus den 103 C-terminalen AS (AS 653-755) und besitzt keine Homologie zu einer Immunglobulindomäne. Das Signalpeptid mit einer Länge von 18 AS befindet sich am N-Terminus. PIGR hat für die Abwehr von Krankheiten große Bedeutung, da das von ihm transportierte sekretorische IgA die erste Immunabwehr des Körpers darstellt. Der Rezeptor ist ein transmembranes Glykoprotein, welches von glandulären epithelialen Zellen verschiedener exokrin sekretorischer Gewebe exprimiert wird. Seine Funktion ist der Transport der polymeren Immunglobuline dIgA und pIgM von der Basalmembran in die Sekrete (Luton & Mostov, 1999). Das geschieht über den Prozess der Transzytose durch die epithelialen Zellen. PIGR wird im rauen Endoplasmatischen Retikulum synthetisiert, dann über den Golgi-Apparat an den trans-Golgi weitergeleitet und in die basolaterale Membran transportiert. Die Signalsequenz dafür befindet sich in der zytoplasmatischen Domäne (AS 653-670). Nach Bindung an dIgA wird der Rezeptor zur apikalen Membran transzytiert. Die Transzytose lässt sich in drei Abschnitte gliedern (Chapin et al., 1996): Erstens, die Internalisierung des rezeptorgebundenen dIgA über Klathrin-beschichtete Vertiefungen in basolaterale frühe Endosomen. Als zweites folgt der mikrotubuliabhängige Transport zu Endosomen direkt unterhalb der apikalen Plasmamembran (apikale Recycling-Endosomen). Abschnitt drei ist der Transport in die apikale Membran. Gebunden werden die polymeren Immunglobuline über ihre J-Kette an PIGR. Die erste Interaktion zwischen der J-Kette von dIgA und dem Rezeptor findet an Domäne eins statt und wird dann über zwei Cysteinbrücken in Domäne fünf stabilisiert

(Johansen et al., 1998). Die Bindung von dIgA führt zur Dimerisierung von PIGR und zur Stimulation der Transzytose (Song et al., 1994). Schritt eins der Transzytose wird durch die Phosphorylierung von Ser-726 reguliert, Abschnitt zwei durch die Phosphorylierung von Ser-664 in der zytoplasmatischen Domäne. Durch diese Phosphorylierung erfolgt die Aktivierung des Phosphatidylinositol-Metabolismus durch Phosphorylierung der Phosphatidylinositol-spezifischen PLC- γ 1, welche Schritt drei der Transzytose reguliert. PLC- γ 1 muss durch eine bisher nicht identifizierte assoziierte Tyrosinkinase phosphoryliert werden, da keine intrinsische Tyrosinkinaseaktivität für den PIGR festgestellt wurde. Die PLC- γ 1 spaltet membranständiges Phosphatidylinositol-3,4,5-Trisphosphat in die Sekundärbotenstoffe Inositol-1,4,5-Triphosphat und Diacylglycerol. Inositol-1,4,5-Triphosphat führt dann zur Freisetzung von intrazellulärem Ca^{2+} , welches Einfluss auf viele Signaltransduktionswege hat. Die Abgabe der transzytierten Immunglobuline an die Sekrete erfolgt durch Proteolyse zwischen der ektoplasmatichen und der membrandurchspannenden Domäne (AS 535-536) von PIGR. Ein Teil des Rezeptors wird bei der Sekretion der Immunglobuline mit abgespalten (die so genannte „Sekretorische Komponente“, 80 kDa) und liegt dann frei oder an Immunglobuline gebunden im Sekret vor. Durch die Bindung der Sekretorischen Komponente wird dIgA im Sekret stabilisiert. Im Zusammenhang mit der Transzytose von PIGR wurde bisher die Funktion des Ca^{2+} -Rezeptors Calmodulin untersucht (Chapin et al., 1996). In Anwesenheit von Ca^{2+} bindet Calmodulin an die Signalsequenz für den Transport zur basolateralen Membran und könnte damit in die negative Regulation der Transzytose involviert sein. Nach der Bindung von Calmodulin an die Signalsequenz ist die Aminosäure Ser-664 nicht mehr für die Phosphorylierung in Schritt zwei der Transzytose zugänglich.

Die in dieser Arbeit durchgeführten Quantifizierungsexperimente bestätigen die „*in silico*“-Analysen zur Expression von PIGR. Die Transkription dieses Gens ist in duktalem Mammakarzinomen im Vergleich zu Normalgewebe stark herunter reguliert. Diese Ergebnisse würden für ein potentiell Tumorsuppressorgen sprechen. Um zu untersuchen, ob es sich bei dem gefundenen Gen tatsächlich um ein an der Entstehung und/oder Progression von Tumoren beteiligtes Gen handelt, wurden die folgenden funktionellen Untersuchungen durchgeführt. In einer *in vitro*-Analyse zur Proliferation sollte von Mammakarzinomzelllinien transfiziert mit PIGR eine Verringerung des Wachstums der Zellen nachgewiesen werden. Es wurden fünf Zelllinien untersucht. Bei der Auswertung dieses Experimentes wurde festgestellt, dass in drei der Zelllinien keine veränderte Wachstumsgeschwindigkeit vorlag, in einer Zelllinie (MCF 7) wurde eine erhöhte und in einer Zelllinie (MFM 223) eine verringerte Wachstumsrate festgestellt. Da die Analysen zur Wachstumsgeschwindigkeit von PIGR nur

widersprüchliche Resultate lieferten, kann davon ausgegangen werden, dass der PIGR keinen Einfluss auf die Wachstumsgeschwindigkeit von Mammarkarzinomzelllinien hat. Die Untersuchung zur Koloniebildung lieferte eindeutige Ergebnisse. In den vier mit PIGR transfizierten Zelllinien EFM 19, KS wt, MCF 7 und MFM 223 waren deutlich weniger Kolonien ausgewachsen als in den Kontrolltransfektionen mit dem Leervektor. Nur zwei Zelllinien (MCF 10a und SKB R3) zeigten eine stärkere Koloniebildung. Möglicherweise könnten Proteine, die durch die Freisetzung von Ca^{2+} und Diacylglycerol in der Zelle bei der Transzytose von PIGR entstehen, einen Einfluss auf die Koloniebildungsrate der Zellen haben.

Es gibt in der vorliegenden Literatur keine Hinweise auf einen kausalen Zusammenhang zwischen der Expression von PIGR und der Entwicklung und/oder Progression von Tumoren. Möglicherweise ist seine schwache Expression in etablierten Tumoren durch die fehlende Aktivierung des Promotors durch Zytokine erklärbar. Im Tumor findet nur noch die geringe Basalexpression von PIGR statt. Aufschluss darüber könnten immunhistochemische Analysen der Transkriptionsfaktoren von PIGR in Tumor- und Normalgewebe geben. Aus diesem Grund stellt das Protein wahrscheinlich keinen Tumormarker dar.

4.5 Das Kandidatengen capG (bt 11)

Nach einem Datenbankabgleich ergaben sich für die cDNA-Klone AA622024 und H45766 Übereinstimmungen mit verschiedenen Datenbankeinträgen für „*capping protein*“, „*macrophage capping protein*“ und „*CapG (gelsolin-like)*“. Laut Nomenklatur wurde der Name CapG für dieses Protein festgelegt (Southwick, 1994). Im Weiteren wird für den cDNA-Klon mit der Gen-ID bt 11 die Bezeichnung CapG verwendet. Zur Klonierung von capG (bt 11) wurden anhand des Datenbankeintrags XM_034183 die in Tabelle 16 und 17 beschriebenen Klonierungsprimer ausgewählt. Die Klonierung wurde an RNA aus Mamma Normalgewebe durchgeführt. Das resultierende PCR-Produkt hatte eine Länge von 1047 bp. Der sequenzierte Klon zeigte 100 % Homologie zu XM_034183. Dieser Datenbankeintrag wurde später durch einen Eintrag mit der Zugriffsnummer NM_001747 und der Bezeichnung „*Homo sapiens capping protein (actin filament), gelsolin-like (CapG)*“ ersetzt.

Das Gen hat laut Eintrag in der Datenbank des NCBI eine Länge von 15,6 kb und besteht aus 10 Exons. Es wurde auf Chromosom 2cen-q24 lokalisiert. Eine Promotorregion von 947 bp Länge konnte mit der Software Eldorado identifiziert werden. Anschließend wurde eine Analyse dieser potentiellen Promotorregion mit der Software MatInspector durchgeführt. Viele Transkriptionsfaktoren, die an diesen Promotor binden, sind spezifisch für die

Genexpression während der Embryonalentwicklung (CDX-1, KLF3, Onecut 2) und Entwicklung und Differenzierung verschiedener Organsysteme (SRY, Meis1) und des hämatopoetischen Systems (CP2, AML1, Arnt). Für das Gen *capG* wurden Bindungsstellen für MAZ (*MYC-associated zinc finger protein*), SP1 und „CCAAT/enhancer-binding protein“-Elemente detektiert, welche für eine konstitutive Expression verantwortlich sind. Für das Gen *capG* wurde keine TATA-Box identifiziert. Es besitzt stattdessen Bindungsstellen für das *core promoter binding protein* (CPBP), welches an der Regulation der Expression von Genen ohne TATA-Box beteiligt ist. Die Transkriptionsfaktoren TIEG1 und GATA3 wurden in verschiedenen Studien als potentielle Tumorsuppressorgene beschrieben (Reinholz et al., 2004; Mehra et al., 2005). Sie sind im Mammakarzinom stark herunter reguliert.

Zur Untersuchung der Transkription von CapG in humanen Normalgeweben wurden der „*Northern Territory TM – Human Normal Tissue Blot I*“, der „*Hu Normal mRNA Blot IV*“ und der „*Human MTN Blot*“ mit dem kompletten offenen Leserahmen hybridisiert. Es konnte in allen Blots eine singuläre Bande mit einer Größe von 1,2 kb detektiert werden. Hybridisierungssignale wurden in den aufgetragenen RNA-Extrakten von Niere, Lunge, Zervix, Hoden und Prostata gefunden. Signale fehlten in den Proben von Herz, Hirn, Leber, Pankreas, Milz, Plazenta, Uterus, Ovar und Muskel. In der Literatur wurde ein Hybridisierungssignal mit einer Größe von 1,2 kb beschrieben (Dabiri et al., 1992). Die mRNA wird in der Datenbank des NCBI und in der Literatur (Dabiri et al., 1992) mit einer Größe von 1221 bp angegeben. Damit stimmen die bei den eigenen Analysen gefundenen Bandengrößen überein. Das Startcodon wurde bei bp 50 und das Stopcodon bei bp 1094 der mRNA detektiert, das zugehörige polyA-Signal befindet sich bei bp 1200-1205 (Dabiri et al., 1992). Die mRNA enthält eine lange 3′- (125 bp) UTR und kürzere 5′- (35 bp) untranslatierte Region. Im Widerspruch zu den eigenen Analysen stehen die in der Literatur beschriebenen Hybridisierungssignale in wenigen Geweben. Von Yu und Kollegen wurde CapG in vielen Geweben detektiert, wohingegen die Arbeitsgruppe von Prendergast und Ziff Signale nur in Lunge, Niere und Herz finden konnte. Eine weitere Arbeitsgruppe (Dabiri et al., 1992) detektierte eine Transkription von CapG in Makrophagen, Monozyten und Niere. Die an den Mammakarzinomzelllinien durchgeführten Echtzeit-PCRs ergaben nur in der Zelllinie MFM 223 eine deutliche Expression von CapG. Alle weiteren sechs untersuchten Brustkrebszelllinien wiesen keine Hybridisierungssignale auf. Bei den durchgeführten RNA-RNA-*in situ*-Hybridisierungen wurde in den untersuchten Normalgeweben in 14 von 18 Fällen in den Lobuli und Ducti eine schwache Expression von CapG gefunden. Vier der untersuchten Normalgewebeproben hybridisierten nicht. Demgegenüber war in 19 der 20 untersuchten

Tumorgewebe eine positive Expression zu erkennen. Von diesen reagierten die invasiv duktales Karzinome Grad 3 stärker als die niedriggradigen. Der einzige Tumor ohne Hybridisierungssignal ist das untersuchte invasiv lobuläre Karzinom. Anhand des in der RNA-RNA-*in situ*-Hybridisierung gefundenen Expressionsmusters lässt sich die spezifische Transkription von CapG in duktales höhergradigen Mammakarzinomen nachweisen. Die Ergebnisse der RNA-RNA-*in situ*-Hybridisierung sollten in Zukunft an mehr duktales Mammakarzinomen mit unterschiedlichem Ausprägungsgrad und weiteren lobulären Karzinomen bestätigt werden. Die aus den RNA-RNA-*in situ*-Hybridisierung erhaltenen Transkriptionsdaten stimmen mit den Ergebnissen der Quantifizierungsexperimente sehr gut überein. Die Hybridisierung eines „*human matched tumor/normal expression array*“ ergab eine 19%ige Heraufregulation der Transkription von CapG in den Mammakarzinomproben gegenüber Normalgewebeprobe (Dahl et al., 2005). Das stimmt mit den Ergebnissen aus den eigenen Analysen der cDNA-Dot-Blots überein. Hier wurde auch nur eine 19%ige Heraufregulation gefunden. Im Gegensatz dazu zeigte sich eine 54%ige Heraufregulation bei Echtzeit-PCR-Analysen. Bei eigenen Echtzeit-PCR-Analysen ergab sich eine Heraufregulation der Transkription von CapG in 100 % der untersuchten Tumore gegenüber den Normalgeweben. Erklärbar ist dieser Unterschied zwischen den Ergebnissen der beiden Untersuchungsmethoden durch die höhere Sensitivität und den größeren dynamischen Messbereich der Echtzeit-PCR. Zur Bestätigung der Analysen auf mRNA-Ebene müssten immunhistochemische Untersuchungen an Gewebeschnitten von Tumor- und Normalgeweben der Mamma durchgeführt werden.

Das untersuchte Protein gehört in die Gelsolin-Proteinfamilie, welche bisher aus sechs Mitgliedern besteht (Witke et al., 2001). Gelsolin und CapG sind Komponenten eines Signalweges, der externe Stimuli an das Zytoskelett weiterleitet. Die Aminosäuresequenz von CapG besitzt 49% Identität zur aminoterminalen Hälfte von Gelsolin. Das Protein setzt sich aus drei Kalzium- und Aktin-bindenden Gelsolin-Homologie-Domänen zusammen (Yu et al., 1990). Bei physiologischen Kalziumkonzentrationen werden von CapG die Aktinfilamente an ihrem positiven Ende abgedeckt (Young et al., 1994). Das bedingt eine Stabilisierung der Filamente. Im Unterschied zu Gelsolin und anderen Mitgliedern der Proteinfamilie kann CapG keine Monomere von den Filamenten abtrennen, sondern nur binden (Southwick, 1995). Dieser Unterschied lässt sich auf Differenzen in der Aminosäuresequenz in Domäne 1 und zwischen Domäne 1 und 2 zurückführen. Sinkt die Kalziumkonzentration in der Zelle, dissoziieren die CapG-Aktin-Komplexe und die Aktinfilamente können verlängert werden. CapG wird durch Kalzium aktiviert, das heißt bei höherer Kalziumkonzentration in der Zelle

bindet es an die Aktinfilamente. Durch Phosphatidylinositolbisphosphat wird CapG inhibiert (Sun et al., 1997). An CapG gebundenes Phosphatidylinositolbisphosphat wird durch PLC γ verstärkt hydrolysiert. Das führt zur vermehrten Bildung von Inositoltrisphosphat, Kalzium und anderen Sekundärbotenstoffen, welche die Bewegung von Zellen direkt oder indirekt beeinflussen.

Aufgrund der verschiedenen Expressionsanalysen für CapG lässt sich sagen, dass die Expression dieses Gens in duktalem Mammakarzinomen im Vergleich zu Normalgewebe stark erhöht ist. Diese Ergebnisse würden für ein potentiell Onkogen sprechen. Ob es sich bei dem gefundenen Gen tatsächlich um ein an der Entstehung und/oder Progression von Tumoren beteiligtes Gen handelt, sollten die folgenden funktionellen Untersuchungen zeigen. In einer *in vitro*-Analyse zur Proliferation sollte in Mammakarzinomzelllinien transfiziert mit CapG eine Erhöhung der Wachstumsgeschwindigkeit der Zellen nachgewiesen werden. Es wurden drei Zelllinien untersucht. Bei der Auswertung dieses Experimentes wurde festgestellt, dass in zwei (KS wt, MCF 7) der drei Zelllinien eine erhöhte Wachstumsgeschwindigkeit vorlag. Man kann bei diesem Ergebnis davon ausgehen, dass CapG einen Einfluss auf die Wachstumsgeschwindigkeit von Mammakarzinomzelllinien hat. Ein widersprüchliches Ergebnis ergaben die Analysen zur Koloniebildung. Es wurden fünf Mammakarzinomzelllinien untersucht. In zwei Zelllinien wurde eine verringerte Koloniebildung der mit CapG transfizierten Zellen gegenüber Leervektor-transfizierten Zellen gemessen. Demgegenüber wurde in zwei anderen Zelllinien eine stärkere und in einer Zelllinie keine veränderte Koloniebildung gefunden. Ursachen für diese Differenzen könnten im genetischen Hintergrund der verwendeten Zelllinien liegen. Es gibt in der vorliegenden Literatur keine Hinweise darauf, ob die Modulierung des Zytoskeletts durch CapG einen Einfluss auf die Wachstumsgeschwindigkeit der Zellen oder ihre Koloniebildungsrate hat. Außerdem sollte in einem *in vitro*-Assay zur Invasivität von CapG-transfizierten nicht invasiv wachsenden Zelllinien eine Änderung des Migrationsverhaltens nachgewiesen werden. In der Literatur (Sun et al., 1995) wurden Hinweise darauf gefunden, dass eine Überexpression von CapG die chemotaktische Zellmotilität erhöht. Bei der Auswertung der vorliegenden Experimente ließ sich eine Veränderung in der Invasivität der CapG-transfizierten Zellen im Vergleich zu den mit dem Leervektor transfizierten Zellen nachweisen. Die Zelllinien KS wt und MCF 7 zeigten nach Transfektion moderates invasives Wachstum. Dies stimmt mit den vorhandenen Daten überein. Aus der Literatur (Sun et al., 1995) ist bekannt, dass mit CapG transfizierte Zellen keine starke Überexpression über einen längeren Zeitraum akzeptieren. Es kann nur eine zweifache Überexpression erreicht werden. Diese hat keinen Einfluss auf den

Aufbau von Aktinfilamenten, aber auf die von CapG beeinflussten Signalkaskaden. CapG-Überexpression erhöht den PDGF-induzierten Phosphoinositidumsatz und verstärkt die Hydrolyse von Phosphatidylinositolbisphosphat durch die PLC γ . Das führt zu einer verstärkten Bildung verschiedener bedeutender Sekundärbotenstoffe und letztendlich auch zu weiterer Aktivierung von CapG. Dadurch kommt es zu einer verstärkten Migration der Zellen. Die Ergebnisse der durchgeführten Analysen zu Proliferations- und Invasionsverhalten von Mammakarzinomzelllinien, die mit CapG transfiziert wurden, ergeben weitere Daten, die die Rolle von CapG als potentiell Onkogen bestätigen. CapG könnte das Tumorwachstum beschleunigen und die Metastasierung von invasiven Tumortypen erleichtern. Zur tiefer gehenden Analyse der Funktion bei der Metastasierung könnten der Invasionsassay und ein Zelladhäsionsassay für weitere Mammakarzinomzelllinien und etablierte Normalgewebezelllinien durchgeführt werden. Weiterhin sollen auch in vivo-Experimente an Mausmodellen für Mammakarzinome durchgeführt werden.

4.6 Das Kandidatengen 14-3-3 zeta (ot 59)

Bei einem Datenbankabgleich mit den cDNA-Klonen AA171458, AA100745 und N28626 (Gen-ID ot 59) ergaben sich die höchsten Homologien zu dem Datenbankeintrag mit der Zugriffsnummer NM_003406: „*Homo sapiens tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, zeta polypeptide (YWHAZ) mRNA*“. Synonyme unter denen dieses Protein ebenfalls in der Datenbank eingetragen ist, sind: „*Proteinkinase C inhibitor Protein-1*“, „*Phospholipase A2*“ und „*14-3-3 zeta*“. Es konnte nur Literatur über das Protein 14-3-3 zeta eindeutig unserem Kandidatengen zugeordnet werden. Im Weiteren wird für den cDNA-Klon mit der Gen-ID ot 59 die Bezeichnung 14-3-3 zeta verwendet. Zur Klonierung von 14-3-3 zeta wurden anhand des Datenbankeintrags NM_003406 die in Tabelle 16 und 17 beschriebenen Klonierungsprimer ausgewählt. Die Klonierung wurde an RNA aus Mamma Normalgewebe durchgeführt. Das resultierende PCR-Produkt hatte eine Länge von 738 bp. Der sequenzierte Klon zeigte 100 % Homologie zu NM_003406.

Das Gen besitzt laut Eintrag in der Datenbank des NCBI eine Länge von 34,6 kb und besteht aus sechs Exons. Vor dem Exon 1 wurde eine Promotorregion von 601 bp Länge identifiziert (ElDorado). Das Gen *14-3-3 zeta* wurde auf Chromosom 8q23.1 lokalisiert. Eine Analyse der potentiellen Promotorregion mit der Software MatInspector ergab verschiedene Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren, welche in der Embryonalentwicklung von Bedeutung sind. Dazu gehören en-1, PAX3 und ngn 1. Außerdem wurden Transkriptionsfaktorbindungsstellen für die Regulation der Genexpression in der Entwicklung des hämatopoetischen Systems

(Pbx1/Meis1, Evi1 und NMP4) und des Nervensystems (HMX3, Myt1, E4BP4 und LIM) gefunden. Für das Gen *14-3-3 zeta* wurden Bindungsstellen für SP1 und „CCAAT/enhancer-binding protein“-Elemente detektiert, welche für eine konstitutive Expression verantwortlich sind. Innerhalb der Promotorregion konnte eine TATA-Box und eine CCAAT-Box identifiziert werden. Der Transkriptionsfaktor GATA3 wurde als potentielle Tumorsuppressorgene beschrieben (Mehra et al., 2005). Er ist im Mammakarzinom stark herunter reguliert. AML3 ist ein spezifischer Marker für Knochenmetastasierungen bei Brustkrebs (Barnes et al., 2003). Evi1, ein weiterer Transkriptionsfaktor mit mehreren Bindungsstellen im Promotor von *14-3-3 zeta* wurde als Onkogen beschrieben (Romano, 2005; Hirai et al., 2001).

Die mRNA wird in der Datenbank des NCBI und in der Literatur (Zupan et al., 1992) mit einer Größe von 2834 bp angegeben. Mit Hilfe der Software Eldorado wurden eine 73 bp lange 5'-untranslatierte Region und eine 2012 bp lange 3'-UTR detektiert. Die an den Mammakarzinomzelllinien durchgeführten Echtzeit-PCRs ergaben in den Zelllinien KS wt, MCF 7, MCF 10a und MFM 223 eine deutliche Expression von *14-3-3 zeta*. Alle weiteren drei untersuchten Brustkrebszelllinien wiesen keine Hybridisierungssignale auf. Bei den durchgeführten RNA-RNA-*in situ*-Hybridisierungen wurde in den 18 untersuchten Normalgeweben in den Lobuli und Ducti eine negative oder schwache Expression von *14-3-3 zeta* gefunden. Demgegenüber zeigten 17 der 20 untersuchten Tumore mittlere bis sehr starke Hybridisierungssignale, welche in drei Fällen heterogen über die Tumoreareale verteilt waren. Drei weitere Tumore reagierten schwach positiv. Anhand des in der RNA-RNA-*in situ*-Hybridisierung gefundenen Expressionsmusters lässt sich die spezifische Transkription von *14-3-3 zeta* in duktalem Mammakarzinomen nachweisen. Die starken Hybridisierungssignale wurden in hochgradigen invasiv duktalem Karzinomen gefunden, die drei mittleren in invasiv duktalem Karzinomen Grad 2. Schwach positiv und damit vergleichbar mit den untersuchten Normalgeweben reagierten ein tubuläres Karzinom, ein invasiv lobuläres Karzinom und ein kribirform mucinöses Karzinom. Die mit den RNA-RNA-*in situ*-Hybridisierung erhaltenen Transkriptionsdaten stimmen mit den Ergebnissen der Quantifizierungsexperimente sehr gut überein. Zur Bestätigung der Analysen auf Proteinebene müssten immunhistochemische Untersuchungen an Gewebeschnitten von Tumor- und Normalgeweben der Mamma durchgeführt werden.

Die *14-3-3* Proteine bilden eine Familie sehr ähnlicher zytosolischer Proteine mit einer Größe von ca. 30 kDa. In Mammalia wurden bisher neun Isoformen identifiziert (α , β , γ , δ , ϵ , η , σ , τ und ζ), welche in verschiedenen Geweben unterschiedlich exprimiert werden (Zannis-

Hadjopoulos et al., 2002). Die 14-3-3-Proteine sind an einer großen Anzahl zellulärer Aktivitäten beteiligt. Sie bilden Homo- oder Heterotrimere und funktionieren als Adapter- oder Gerüstproteine (Yaffe, 2002). Die Interaktion mit ihren Proteinliganden findet über Sequenzen, die Phosphoserin oder Phosphothreonin enthalten statt. Die 14-3-3-Proteine nehmen an der räumlichen Organisation von Signalkomplexen und der subzellulären Lokalisation von Proteinen teil. Dazu gehören Regulation von Zellproliferation und Apoptose und die Regulation des Zellzyklus und der Genexpression (Rosenquist, 2003, Zannis-Hadjopoulos et al., 2002). Außerdem sind 14-3-3-Proteine an der Organisation von Zytoskelett, Vesikeltransport und Exozytose beteiligt. Es sind inzwischen über 100 Interaktionspartner für 14-3-3-Proteine bekannt. Das Protein 14-3-3 zeta hat eine Länge von 245 Aminosäuren. Die für die Proteinfamilie typische 14-3-3-Domäne erstreckt sich von Aminosäure 9 bis 232. Es gibt nur wenige Untersuchungen zu Interaktionspartnern von 14-3-3 zeta. Powell und Kollegen fanden, dass die MAPKAPK2 mit 14-3-3 zeta interagiert und es an Ser-58 phosphoryliert. Diese Phosphorylierung reguliert die Dimerisierung und Ligandenbindung des Proteins. Außerdem wurde von dieser Arbeitsgruppe eine Interaktion von 14-3-3 zeta und PKB/Akt gefunden (Powell et al., 2002). Das Protein 14-3-3 zeta ist an der Insulin-vermittelten Signaltransduktion beteiligt (Ogihara et al., 1997). Es bindet an Serin-phosphoryliertes Insulinrezeptorsubstrat-1 und hemmt dadurch die Insulinrezeptortyrosinkinase. Birkenfeld und Kollegen fanden 2003 in dem Protein Cofilin einen Interaktionspartner von 14-3-3 zeta, der an dynamischen Veränderungen des Zytoskeletts beteiligt ist. Er entfernt Aktinmonomere von den negativen Enden der Aktinfilamente. Cofilin besitzt in seiner N-terminalen Region eine 14-3-3-Bindungssequenz. Reguliert wird Cofilin durch Phosphorylierung durch die LIMK1 an einem Serin (Ser-3), was zur Inaktivierung führt. Es wurden komplexe Interaktionen von 14-3-3 zeta, Cofilin und LIMK1 in der Regulation der Aktindynamik gefunden.

Aufgrund der verschiedenen Expressionsanalysen für 14-3-3 zeta lässt sich sagen, dass die Expression dieses Gens in dukalen Mammakarzinomen im Vergleich zu Normalgewebe sehr stark erhöht ist. Diese Ergebnisse würden für ein potentiell Onkogen sprechen. Ob es sich bei dem gefundenen Gen tatsächlich um ein an der Entstehung und/oder Progression von Tumoren beteiligtes Gen handelt, sollten die folgenden funktionellen Untersuchungen zeigen. In einem in vitro Assay zur Proliferation sollte in Mammakarzinomzelllinien transfiziert mit 14-3-3 zeta eine Erhöhung der Wachstumsgeschwindigkeit der Zellen nachgewiesen werden. Es wurden drei Zelllinien untersucht. Bei der Auswertung dieses Experimentes wurde festgestellt, dass in zwei (EFM 19 und MFM 223) der drei Zelllinien keine veränderte

Wachstumsgeschwindigkeit vorlag. Man kann bei diesem Ergebnis davon ausgehen, dass 14-3-3 zeta keinen Einfluss auf die Wachstumsgeschwindigkeit der untersuchten Mammarkarzinomzelllinien hat. Ähnliche Ergebnisse ergaben die Analysen zur Koloniebildung. In den zwei Zelllinien BT 474 und SKB-R3 wurde eine vermehrte Koloniebildung der mit 14-3-3 zeta transfizierten Zellen gegenüber Leervektor-transfizierten Zellen gemessen. Demgegenüber wurde in den Zelllinien MFM 223 und MCF 7 eine geringere Koloniebildung und in der Zelllinie EFM 19 keine Veränderung der Koloniebildung gefunden. Ursachen für diese Differenzen könnten im genetischen Hintergrund der verwendeten Zelllinien liegen. Damit kann man davon ausgehen, dass 14-3-3 zeta keinen Einfluss auf die Fähigkeit der untersuchten Einzelzellen, ihr Medium zu konditionieren und auf dem Untergrund anzuwachsen hat. Es gibt in der vorliegenden Literatur keine Hinweise darauf, ob einige der potentiellen Interaktionspartner von 14-3-3 zeta einen Einfluss auf die Wachstumsgeschwindigkeit und die Koloniebildungsrate von Tumorzelllinien haben. Die vorliegenden Analysen sollten mit Zellkulturen aus Normalgewebe der Mamma nach stabiler Transfektion von 14-3-3 zeta wiederholt werden. Außerdem sollten die Ergebnisse der RNA-RNA-*in situ*-Hybridisierung an mehr Fällen mit verschiedenen TNM-Stadien und anderen Tumorarten bestätigt werden. Außerdem könnten an verschiedenen Zellkulturen und Zelllinien Analysen des Invasionsverhaltens nach stabiler Transfektion mit 14-3-3 zeta durchgeführt werden. Damit könnte man Hinweise auf die beschriebene Beteiligung von 14-3-3 zeta an dynamischen Veränderungen des Zytoskeletts (Birkenfeld et al., 2003) und damit der Beweglichkeit der Zellen erhalten.

4.7 Das Kandidatengen FABP5 (ot 89)

Nach einem Datenbankabgleich ergaben sich für die cDNA-Klone AI208938 und H58270 Übereinstimmungen mit verschiedenen Datenbankeinträgen für das „*psoriasis-associated fatty acid binding protein*“. Alternative Bezeichnungen für dieses Protein sind „*fatty acid binding protein 5 (FABP5)*“ oder „*epidermal fatty acid binding protein*“. Im Weiteren wird für den cDNA-Klon mit der Gen-ID ot 89 die Bezeichnung FABP5 verwendet. Zur Klonierung von FABP5 wurden anhand des Datenbankeintrags NM_001444 die in Tabelle 16 und 17 beschriebenen Klonierungsprimer ausgewählt. Die Klonierung wurde an RNA aus Mamma Normalgewebe durchgeführt. Das resultierende PCR-Produkt besaß eine Länge von 408 bp. Der sequenzierte Klon zeigte 100 % Homologie zu NM_001444.

Das Gen hat laut Eintrag in der Datenbank des NCBI eine Länge von 4,2 kb und besteht aus vier Exons. Es wurde auf Chromosom 8q21.13 lokalisiert. Mit Hilfe der Software EIDorado wurde eine 661 bp lange Promotorregion identifiziert. Anschließend wurde eine Analyse dieser potentiellen Promotorregion mit der Software MatInspector durchgeführt. Viele Transkriptionsfaktoren, die an diesen Promotor binden, sind spezifisch für die Genexpression während der Embryonalentwicklung (Thing1/E47, en-1, Hox 1.3) und Entwicklung und Differenzierung verschiedener Organsysteme (Nkx 2.5/Csx, PAX-6, FOXO1). Für das Gen *FABP* wurden Bindungsstellen für MAZ (*MYC-associated zinc finger protein*) und „CCAAT/-enhancer-binding protein“-Elemente detektiert, welche für eine konstitutive Expression verantwortlich sind. Außerdem wurde eine TATA-Box identifiziert. Der Transkriptionsfaktor GATA3 wurde als potentielle Tumorsuppressorgene beschrieben (Mehra et al., 2005). Er ist im Mammakarzinom stark herunter reguliert. FKHRL1 ist in invasiven duktalen Mammakarzinomen sehr häufig aktiviert (Jin et al., 2004) und scheint einen Marker für die Metastasierung darzustellen. Evi1, ein weiterer Transkriptionsfaktor mit Bindungsstellen im Promotor von FABP wurde als Onkogen beschrieben (Romano, 2005; Hirai et al., 2001).

Zur Untersuchung der Transkription von FABP5 in humanen Normalgeweben wurden der „Northern Territory TM – Human Normal Tissue Blot I“, der „Hu Normal mRNA Blot IV“ und der „Human MTN Blot“ mit dem kompletten offenen Leserahmen hybridisiert. Es konnte in allen Blots eine singuläre Bande mit einer Größe von 0,9 kb detektiert werden. Hybridisierungssignale wurden in den RNA-Extrakten von Herz, Niere, Lunge, Milz, Muskel, Zervix, Ovar, Hoden, Prostata, Plazenta und Pankreas gefunden. Signale fehlten in den Proben von Hirn, Leber und Uterus. In der Literatur wurde ein Hybridisierungssignal mit einer Größe von 0,6 bis 0,7 kb in benignen und malignen Prostata- und Brustzelllinien beschrieben (Jing et al., 2000). Es gibt keine Literaturangaben zur Expression von FABP5 in humanen Normalgeweben zum Vergleich. Durchgeführt wurden nur immunhistochemische Lokalisationen des Proteins (Masouyé et al., 1997). Die mRNA wird in der Datenbank des NCBI mit einer Größe von 662 bp angegeben. Mit Hilfe der Software EIDorado wurden eine 46 bp lange 5'-untranslatierte Region und eine 206 bp lange 3'-UTR detektiert. Zusammen mit dem klonierten offenen Leserahmen (408 bp) würde das eine Länge von 660 bp ergeben. Ein polyA-Signal konnte nicht gefunden werden. Die bei den eigenen Analysen gefundenen Bandengrößen stimmen nicht mit den Literaturangaben und der rechnerisch ermittelten Größe der mRNA überein. Die an den Mammakarzinomzelllinien durchgeführten Echtzeit-PCRs ergaben nur in der Zelllinie MCF 10a eine deutliche Expression von FABP5. Alle weiteren sechs untersuchten Brustkrebszelllinien wiesen keine Hybridisierungssignale auf. Bei den

durchgeführten RNA-RNA-*in situ*-Hybridisierungen wurde in den untersuchten Tumor- und Normalgewebeproben bei *sense*- und *antisense*-Proben gleichmäßig schwache bis negative Hybridisierungssignale detektiert. Aus diesem Grund war dieses Experiment nicht auswertbar. Zur Bestätigung der Analysen auf mRNA-Ebene müssten immunhistochemische Untersuchungen an Gewebeschnitten von Tumor- und Normalgeweben der Mamma durchgeführt werden. Bisher wurde nur eine Untersuchung auf Spezifität des Antikörpers im Western-Blot durchgeführt. Die mit FABP5 (ot 89) transfizierten Zellen zeigten eine starke Bande in erwarteter Größe, welche bei mit dem Leervektor transfizierten Zellen fehlt. Das gleiche Ergebnis sieht man bei induziertem und nicht induziertem Bakterienlysate. Bei dem Bakterienlysate, das nach Induktion der Bakterien durch IPTG das Protein FABP5 exprimiert zeigt im Western-Blot eine deutliche Hybridisierungsbande. Von Masouyé und Kollegen (1997) wurde mit immunhistochemischen Untersuchungen gezeigt, dass FABP5 in endothelialen Zellen der Mikrovaskulatur von Plazenta, Herz, Skelettmuskel, Dünndarm, Lunge und Niere exprimiert wird. Die Expression fehlt jedoch in größeren Blutgefäßen. Die mikrovaskulären Endothelzellen spielen eine zentrale Rolle in der Versorgung der Gewebe mit Nährstoffen wie Fettsäuren. Es wird angenommen, dass die Fettsäuren aus dem Blut direkt über das Zytoplasma der Endothelzellen ins Interstitium transportiert werden. Dabei könnten die Fettsäure-bindenden Proteine (FABPs) eine Rolle spielen.

Die FABPs sind eine Familie von kleinen (14-15 kDa) zytosolischen Proteinen mit neun Mitgliedern (Veerkamp & Maatman, 1995). Sie werden gewebespezifisch exprimiert. Die Proteine dieser Familie bestehen aus 127-135 Aminosäuren und sind phylogenetisch miteinander verwandt. Die Sequenzähnlichkeiten zwischen den verschiedenen FABPs liegen bei 38-70%. FABPs gehören einer größeren Familie, den intrazellulären lipidbindenden Proteinen (LBPs), an. Diese Familie wird durch das Vorhandensein einer Lipocalin-Domäne charakterisiert. Im Fall von FABP5 erstreckt sich diese Domäne von Aminosäure 11 bis 134. Die FABPs spielen eine Rolle bei der fettsäurevermittelten Signaltransduktion, in Zellwachstum und Differenzierung. Außerdem sind diese Proteine in die Aufnahme von Lipiden in die Zellen, die Bereitstellung von Lipiden für den Metabolismus und die Regulation metabolischer Proteine involviert. Die Familie der FABPs zeichnet sich durch Aminosäuremotive aus, welche die Bindung von amphiphilen Liganden, wie langkettigen Fettsäuren, Gallensäuren, Retinolsäuren und Eikosanoiden mit hoher Affinität erlauben. Die Tertiärstruktur dieser Proteinfamilie ist hoch konserviert. Sie besteht aus zwei rechtwinklig angeordneten β -Faltblättern mit jeweils fünf antiparallelen β -Strängen und einer Helix-Turn-Helix-Domäne, welche eine wassergefüllte Bindungstasche bilden. Der Ligand wird nicht

kovalent in dieser Tasche gebunden. FABP5 bindet die Fettsäure in einer U-förmigen Konformation, wobei das C-terminale Ende der Fettsäure Wasserstoffbrücken mit hochkonservierten Tyrosin- und Argininresten in der Bindungstasche ausbildet. Der Kohlenwasserstoffrest der Fettsäure bildet van der Waals-Interaktionen mit hydrophoben Resten in der Tasche aus. Der Ligandentransfer erfolgt über elektrostatische Interaktionen mit sauren Membrandomänen oder sauren Peptiden in Targetproteinen (Storch et al., 2000). Eine Besonderheit von FABP5 ist das Vorhandensein von sechs konservierten Cysteinresten, wobei zwischen Cystein 120 und 127 eine Disulfidbrücke ausgebildet wird. Das Bindungszentrum von FABP5 besitzt innerhalb der Proteinfamilie die niedrigste Stabilität. Es besteht die Möglichkeit, dass FABP5 durch die geringe Bindungsstabilität den Fettsäuregehalt in der Zelle erhöht (Zimmerman et al., 2001). Ein Beispiel dafür ist die Bereitstellung von Arachidonsäure für die 5-Lipoxygenase-Oxygenation (Dickinson-Zimmer et al.). Dabei wird Leukotrien A₄, ein chemisch reaktives Produkt der Arachidonsäure, gebildet. Wenn Zellen stimuliert werden, spaltet die zytosolische Phospholipase A₂ Arachidonsäure von Phospholipiden ab. Außerdem wird die 5-Lipoxygenase stimuliert und Leukotrien A₄ produziert. FABP5 transportiert Arachidonsäure zum 5-LO/FLAP-Komplex an der Kernhülle. Dort wird sie in Leukotrien A₄ konvertiert und wieder an FABP gebunden. Dann wird Leukotrien A₄ zur zytosolischen Leukotrien A₄-Hydrolase transportiert und dort in Leukotrien B₄ umgewandelt. FABP5 spielt nicht nur bei der Regulation des Fettsäuregehaltes von Zellen eine Rolle, es wirkt außerdem als Antioxidant (Bennaars-Eiden et al., 2002). Das bedeutet, es inaktiviert reaktive Lipide. FABP5 wird in Geweben mit hohem oxidativem Stress verstärkt exprimiert. Außerdem besitzt das Protein in seiner Bindungstasche Redox-sensitive Sulfhydrylreste, was seine Rolle als antioxidatives Protein bestätigt. Ein relativ stabiles, langlebiges, reaktives Lipid, welches an FABP5 bindet ist 4-Hydroxynonenal (4-HNE). Es wirkt durch kovalente Modifizierung zellulärer Targetproteine zytotoxisch. Das Lipid 4-HNE wird natürlicherweise während der Lipidperoxidation und -spaltung bei oxidativem Stress und Altern produziert.

Aufgrund der Ergebnisse der Echtzeit-PCR-Analysen für FABP5 lässt sich sagen, dass die Expression dieses Gens in einzelnen duktalem Mammakarzinomen im Vergleich zu Normalgewebe stark erhöht ist. Die sechs Tumore in denen die Expression von FABP5 erhöht ist, sind invasiv duktales Mammakarzinome Grad 3. Der Tumor mit der stärksten Heraufregulation (9fach) hat Makrometastasen im regionalen Lymphknoten gebildet. Dieses Ergebnis würde für ein potentiell Onkogen sprechen. Auch Angaben aus der Literatur sprechen dafür. Jing et al. wiesen 2000 eine höhere Expression von FABP5 auf mRNA- und

Protein-Ebene in malignen Prostata- und Brust-Krebszelllinien als in entsprechenden benignen Zelllinien nach. Außerdem beschreiben sie eine höhere Expression in Prostatakarzinomgewebe als in benignen Prostatahyperplasien. Ob es sich bei dem gefundenen Gen tatsächlich um ein an der Entstehung und/oder Progression von Tumoren beteiligtes Gen handelt, sollten die folgenden funktionellen Untersuchungen zeigen. In einem *in vitro* Assay zur Proliferation sollte in Mammakarzinomzelllinien, transfiziert mit FABP5, eine Erhöhung der Wachstumsgeschwindigkeit der Zellen nachgewiesen werden. Es wurden drei Zelllinien untersucht. Bei der Auswertung dieses Experimentes wurde festgestellt, dass in zwei (EFM 19, KS wt) der drei Zelllinien keine veränderte Wachstumsgeschwindigkeit vorlag. In einer Zelllinie (MFM 223) wurde eine verringerte Wachstumsrate festgestellt. Man kann bei diesem Ergebnis davon ausgehen, dass FABP5 keinen Einfluss auf die Wachstumsgeschwindigkeit von Mammakarzinomzelllinien hat. Widersprüchliche Ergebnisse ergaben die Analysen zur Koloniebildung. In den zwei Zelllinien KS wt und SKB-R3 wurde eine vermehrte Koloniebildung der mit FABP5 transfizierten Zellen gegenüber Leervektor-transfizierten Zellen gemessen. Demgegenüber wurde in den zwei Zelllinien EFM 19 und MFM 223 eine geringere Koloniebildung und in der Zelllinie BT 474 keine Änderung in der Koloniezahl gefunden. Ursachen für diese Differenzen könnten im genetischen Hintergrund der verwendeten Zelllinien liegen. Es gibt in der vorliegenden Literatur keine Hinweise darauf, ob FABP5 einen Einfluss auf die Koloniebildungsrate der Zellen hat. Außerdem sollte zukünftig in einem *in vitro*-Assay zur Invasivität von FABP5-transfizierten invasiv wachsenden Zelllinien eine Änderung des Migrationsverhaltens nachgewiesen werden. Aus der Literatur ist bekannt, dass Transfektion in eine nicht metastasierende Rattenmammarykarzinomzelllinie und Inokulation in Ratten eine signifikante Anzahl von Metastasenbildung mit hoher FABP5-Expression in Primärtumor und Metastase ergab (Jing et al., 2001). In dieser Arbeitsgruppe wurde weiterhin festgestellt, dass die Überexpression von FABP5 eine Hochregulation der Expression des VEGF-Gens, welches die Angiogenese stimuliert, bewirkt. Damit könnte FABP5 eine Rolle in der Metastasierungskaskade spielen. Da auch ein Mammakarzinom mit Metastasierung in der Echtzeit-PCR am stärksten herauf reguliert war, sollten weitere Karzinome mit verschiedenen Metastasierungsstadien in der Echtzeit-PCR untersucht werden. Bestätigt sich das Ergebnis aus der ersten Echtzeit-PCR, sollte es mit immunhistochemischen Untersuchungen verifiziert werden. Außerdem kann in den Tumoren mit starker Überexpression von FABP5 die Expression von VEGF im Vergleich zu Normalgeweben analysiert werden. Bestätigen sich die Daten aus dem Artikel von Jing und Kollegen (2001), könnten die beteiligten Signaltransduktionskaskaden analysiert werden.

Eine Invasionsanalyse und weitere Proliferationsanalysen an mit FABP5 stabil transfizierten Mammanormalgewebezelllinien wären außerdem interessant. Zusätzlich kann die Metastasierung im Mausmodell untersucht werden. Sollten die Ergebnisse dieser Untersuchungen Hinweise auf verstärkte Proliferation und Invasion bei Überexpression von FABP5 liefern, spielt FABP5 als potentiell Onkogen eine Rolle bei der Metastasierung von Mammakarzinomen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Gene, deren veränderte Expression mit malignem Wachstum korreliert, identifiziert und validiert. Damit konnte gleichzeitig gezeigt werden, dass die Vorauswahl an Kandidatengenen durch eine *in silico*-Analyse eine geeignete Methode darstellt. Die identifizierten Gene wurden bisher noch nicht mit der Entstehung, Progression und Metastasierung von Mammakarzinomen in Zusammenhang gebracht. Aufgrund der durchgeführten Untersuchungen und Literaturrecherchen lässt sich für die veränderte Expression einiger Kandidatengene ein Zusammenhang mit Entstehung und Progression von Mammakarzinomen vermuten. Ob diese Gene kausal für die Tumorgenese sind oder nur einen Ausdruck des malignen Phänotyps darstellen, muss durch weiterführende Untersuchungen noch geklärt werden. Aufgrund des nachgewiesenen negativen Einflusses von ITIH5 auf das Wachstum von Tumorzellen im Proliferationsassay wird es als tumorrelevantes Gen und potentielles Tumorsuppressorgen betrachtet. CapG wird durch den positiven Einfluss auf die Beweglichkeit von Tumorzellen in der Invasionsanalyse und den positiven Einfluss auf das Wachstum von Tumorzellen im Proliferationsassay ebenfalls als tumorrelevantes Gen betrachtet. Bei capG scheint es sich um ein Onkogen zu handeln. FABP5 könnte als potentielles Onkogen eine Rolle bei der Metastasierung von Mammakarzinomen spielen. Die Daten aus Echtzeit-PCR, cDNA-Dot-Blot und RNA-RNA-*in situ*-Hybridisierung sprechen für eine Relevanz bei der Tumorgenese. Auch alle gefundenen Literaturangaben sprechen dafür. Leider konnte in den durchgeführten funktionellen Analysen kein Hinweis auf einen Einfluss von FABP5 auf die Entstehung und Progression von Mammakarzinomen gefunden werden.

Da in den durchgeführten *Colony Formation Assays* Hinweise auf die Beteiligung von Alpha-B-Crystallin am Tumorstadium gefunden wurden, sollte seine Rolle in der Tumorbologie erst nach weiteren Analysen beurteilt werden.

Es gibt keine Hinweise auf einen kausalen Zusammenhang zwischen der Expression von PIGR und der Entwicklung und/oder Progression von Tumoren. Möglicherweise ist die

schwache PIGR-Expression in etablierten Tumoren durch die fehlende Aktivierung des Promotors durch Zytokine erklärbar. Aus diesem Grund stellt das Protein keinen Tumormarker dar. Die reduzierte Expression ist nur Ausdruck des malignen Phänotyps des Mammakarzinoms.

Für 14-3-3 zeta konnte kein Zusammenhang mit der Entwicklung und/oder Progression von Mammakarzinomen hergestellt werden, da bisher zu wenige spezifische Interaktionspartner dieses Proteins bekannt sind. Aufgrund der bekannten Interaktionspartner, MAPKAPK2, PKB/Akt und Cofilin, lässt sich jedoch vermuten, dass 14-3-3 zeta an bedeutenden Signaltransduktionswegen beteiligt ist. Daher wäre eine Analyse weiterer Interaktionspartner und der Expression von 14-3-3 zeta in verschiedenen Tumorstadien sinnvoll.

Zusammenfassend war bei den durchgeführten funktionellen Tests zu beachten, dass die Proteine in den Zelllinien nicht in physiologischer Konzentration exprimiert werden konnten. Durch die ektopische Expression könnten extreme Effekte auf Wachstum und Invasivität der Zellen ausgelöst worden sein, die nicht durch die Funktion des Proteins selbst, sondern nur durch die zu hohe Konzentration erklärbar sind. Dieses Phänomen ist bei der Interpretation der Ergebnisse berücksichtigt worden. Die widersprüchlichen Ergebnisse der Proliferations- und Invasionsanalysen könnten sich weiterhin durch den unterschiedlichen genetischen Hintergrund der untersuchten Zelllinien ergeben haben. Da unbekannt war, in welcher Zelllinie ein Effekt zu beobachten sein könnte, wurden alle im Labor vorhandenen Mammakarzinomzelllinien untersucht. Bei der Auswertung der Ergebnisse wurde berücksichtigt, dass unterschiedliche Zelllinien verschiedene Ergebnisse liefern können.

Für weiterführende funktionelle Untersuchungen der potentiellen Tumorsuppressorgene ITIH5 und Alpha-B-Crystallin sollen künftig die Tumorzelllinien verwendet werden, welche in den vorliegenden Analysen positive Ergebnisse erbracht haben. Die Proteine sollen außerdem in physiologischer Konzentration exprimiert werden. Ist dann der Effekt auf Wachstum und Invasivität noch vorhanden, können die Ergebnisse als gesichert angenommen werden. Zudem könnte analysiert werden, ob ein Fehlen der potentiellen Tumorsuppressorgene nach Unterbrechung der Expression durch siRNA in Zellkulturen aus gesundem Brustgewebe Wachstums- und Invasivitätseffekte auslöst.

Die Expression der putativen Onkogene capG und FABP5 könnte in weiteren Experimenten in Mammakarzinomzelllinien durch siRNA gehemmt werden. Zusätzlich wäre es interessant, die Onkogene in Zellkulturen aus gesundem Brustgewebe verstärkt zu exprimieren. Kann dann ein Effekt auf Wachstum und Invasivität festgestellt werden, können die Proteine als Onkogene angesehen werden.

Das Ziel der vorliegenden Untersuchungen war, Gene zu identifizieren, welche im Mammakarzinom differentiell exprimiert sind und bisher noch nicht mit diesem Tumortyp in Verbindung gebracht wurden. Diese Analysen waren erfolgreich. Weiterführend können diese neu vorliegenden potentiellen Tumorsuppressorgene und Onkogene daraufhin untersucht werden, ob ein Expressionsmuster der Gene zur Bestätigung der Progression von DCIS zu invasiven Mammakarzinomen zu erkennen ist. Sollte dies der Fall sein, eignen sich die Gene möglicherweise als Prognosefaktoren. Außerdem sollte Wert darauf gelegt werden, die Rolle der vorliegenden Gene als Signalmoleküle in Signaltransduktionswegen aufzuklären, da sich damit möglicherweise neue Ziele für therapeutische Ansätze bieten könnten.

5 Anhang

5.1 Materialien

5.1.1 Chemikalien

Acrylamidlösung (30% (w/v) 29:1 Acrylamid/bisacrylamid)	AppliChem, Darmstadt, BRD
Agarose	Boehringer Mannheim, Mannheim, BRD
Agarose	GIBCO BRL, Karlsruhe, BRD
Ammoniumsulfat	Sigma-Aldrich, Steinheim, BRD
Ammoniumacetat	Merck, Darmstadt, BRD
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Merck, Darmstadt, BRD
Ampicillin	Sigma-Aldrich, Steinheim, BRD
Antifade	Qbiogene, Heidelberg, BRD
Bacto-Agar	Difco, Detroit, USA
Bacto-Trypton	Difco, Detroit, USA
Bacto-Hefeextrakt	Difco, Detroit, USA
BCIP/NBT Solution premixed	Sigma-Aldrich, Steinheim, BRD
Bisacrylamid	Sigma-Aldrich, Steinheim, BRD
Borsäure	Merck, Darmstadt, BRD
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt, BRD
Bovine Serum Albumin (BSA)	Sigma-Aldrich, Steinheim, BRD
Chloroform	Merck, Darmstadt, BRD
Chloramphenicol	Sigma-Aldrich, Steinheim, BRD
5-Chlor-4-Brom-3-indolyl- β -D-Galactosid (x-Gal)	Sigma-Aldrich, Steinheim, BRD
Complete EDTA-fre Protease Inhibitor Cocktail	Roche, Mannheim, BRD
Coomassie Brilliant G250 Blau	BioRad, München, BRD
Cot1 DNA, human	Roche, Mannheim, BRD
Desoxyribonukleotidphosphate (dNTP)	Boehringer Mannheim, Mannheim, BRD
Dextransulfat	Sigma-Aldrich, Steinheim, BRD
Dithiotreitol (DTT)	GIBCO BRL, Karlsruhe, BRD
Dimethylformamid	ICN, Aurora, USA
Dinatriumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt, BRD
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Sigma-Aldrich, Steinheim, BRD
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, Steinheim, BRD
Dulbecco's modified minimal essential medium (DMEM)	GIBCO BRL, Karlsruhe, BRD
Eisessig 98 %	Merck, Darmstadt, BRD
Essigsäureanhydrid	Sigma-Aldrich, Steinheim, BRD
Ethanol 96 %	Baker, Deventer, Niederlande
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich, Steinheim, BRD
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Merck, Darmstadt, BRD
Expresshyb	Clontech, Heidelberg, BRD
Fetales Kälberserum (FCS)	GIBCO BRL, Karlsruhe, BRD
Fixogum	Marabuwerke, Tamcu, BRD
Formamid	Merck, Darmstadt, BRD
Formaldehyd	Merck, Darmstadt, BRD
Glucose	Sigma-Aldrich, Steinheim, BRD
Glycin-Natrium	Merck, Darmstadt, BRD
Glycerin (86%)	Sigma-Aldrich, Steinheim, BRD
Guanidiniumhydrochlorid	ICN, Aurora, USA
Geneticin (G-418-Sulfat)	GIBCO BRL, Karlsruhe, BRD
Harnstoff	Sigma-Aldrich, Steinheim, BRD
Heringssperma-DNA	Roche, Mannheim, BRD
N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-Ethansulfonsäure (HEPES)	Merck, Darmstadt, BRD
Hygromycin B	Sigma-Aldrich, Steinheim, BRD
Isoamylalkohol	Merck, Darmstadt, BRD
Isopropyl- β -Thiogalactopyranidose (IPTG)	Boehringer Mannheim, Mannheim, BRD
ITSS (Insulin-Transferrin-Sodium-Selenit)	Invitrogen, Karlsruhe, BRD
Kaliumchlorid (KCl)	Sigma-Aldrich, Steinheim, BRD

Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4)	Merck, Darmstadt, BRD
Kalziumchlorid	Sigma-Aldrich, Steinheim, BRD
Kanamycin	Sigma-Aldrich, Steinheim, BRD
Lachssperma-DNA	Sigma-Aldrich, Steinheim, BRD
Lysozym	Sigma-Aldrich, Steinheim, BRD
Glutamax	Invitrogen, Karlsruhe, BRD
Magnesiumchlorid (MgCl_2)	Sigma-Aldrich, Steinheim, BRD
Magnesiumsulfat	Merck, Darmstadt, BRD
Matrigel	BD Biosciences, Bedford, USA
β -Mercaptoethanol	Merck, Darmstadt, BRD
Methanol (99,8 %)	Sigma-Aldrich, Steinheim, BRD
Minimal essential medium (MEM)	GIBCO BRL, Karlsruhe, BRD
Morpholinopropansulfonsäure (MOPS)	Roth, Karlsruhe, BRD
Natriumacetat	Merck, Darmstadt, BRD
Natriumacid	Merck, Darmstadt, BRD
Natriumchlorid (NaCl)	Merck, Darmstadt, BRD
Natriumcitrat	Roth, Karlsruhe, BRD
Natriumcarbonat	Roth, Karlsruhe, BRD
Natriumdihydrogenphosphat (NaH_2PO_4)	Merck, Darmstadt, BRD
Natriumdesoxycholat	Sigma-Aldrich, Steinheim, BRD
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Sigma-Aldrich, Steinheim, BRD
Natriumfluorid	Sigma-Aldrich, Steinheim, BRD
Natriumhydrogencarbonat	Roth, Karlsruhe, BRD
di-Natriumhydrogenphosphat (Na_2HPO_4)	Merck, Darmstadt, BRD
Natriumhydroxid (NaOH)	Merck, Darmstadt, BRD
Paraformaldehyd	Sigma-Aldrich, Steinheim, BRD
Penicillin-Streptomycin	GIBCO BRL, Karlsruhe, BRD
Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1)	GIBCO BRL, Karlsruhe, BRD
Phenol, puffergesättigt	GIBCO BRL, Karlsruhe, BRD
Phosphate buffered saline (PBS)	GIBCO BRL, Karlsruhe, BRD
2-Propanol (Isopropanol)	Merck, Darmstadt, BRD
Ponceau S	Sigma-Aldrich, Steinheim, BRD
Protease Inhibitor Cocktail III	CN Biosciences, Schwalbach, BRD
RPMI 1640	GIBCO BRL, Karlsruhe, BRD
Salzsäure (HCl)	Merck, Darmstadt, BRD
Saccharose	Roth, Karlsruhe, BRD
Scim Milk Powder	ICN, Aurora, USA
SYBR TM Green I	Biozym, Hess. Oldendorf, BRD
Tergitol Type NP40 (NP-40)	Sigma-Aldrich, Steinheim, BRD
N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Sigma-Aldrich, Steinheim, BRD
Triethanolamin	Sigma-Aldrich, Steinheim, BRD
Tris-Hydroxymethylaminomethan (Tris)	Merck, Darmstadt, BRD
Triton X-100	Merck, Darmstadt, BRD
Trizol	GIBCO BRL, Karlsruhe, BRD
t-RNA	Boehringer Mannheim, Mannheim, BRD
Trypanblau (0,4 %)	Sigma-Aldrich, Steinheim, BRD
Trypsin-EDTA	GIBCO BRL, Karlsruhe, BRD
Tween 20	Sigma-Aldrich, Steinheim, BRD
Wasserstoffperoxyd (30 %)	Sigma-Aldrich, Steinheim, BRD
Xylenyanol	Merck, Darmstadt, BRD
Ziegenserum (goat serum, whole serum)	DakoCytomation GmbH, Hamburg, BRD

5.1.2 Geräte

Brutschrank	BBD 6220	Heraeus Instruments, Hanau, BRD
Chromatographieanlage (MPLC)	BioLogic LP	BioRad, Hercules, USA
DNA-Crosslinker	GS Gene Linker TM	BioRad, München, BRD
DNA-Sequenzierer	Licor Model 4000	MWG-Biotech, Teddington, UK
Dot-Blot-Anlage		Biometra, Göttingen, BRD
Durchflußzytometer	FACS Calibur	BD Biosciences, Bedford, USA
Elektrophorese-Netzgerät	Power Pack P25	Biometra, Göttingen, BRD
ELISA-Reader	Lambda K	MWG-Biotech, Teddington, UK

Elektrophorese-Kammer	Miniprotean 3	BioRad, München, BRD
	BlueMarine 100 / 200	Serva, Heidelberg, BRD
Elektroporationsgeräte	Gene Pulser® II	BioRad, München, BRD
	Nucleofector TM	Amara Biosystems, Köln, BRD
Gefriermikrotom	Cryotom SME	Thermo Electron Corporation, Berlin, BRD
Geldokumentationsanlage	Video Graphic Printer UP-890CE	Sony, Tokyo, Japan
Hybridisierungsöfen		Heraeus Instruments, Hanau, BRD
PCR-Geräte	Touch Down TCS	MWG-Biotech, Teddington, UK
	Mastercycler Gradient	Eppendorf, Hamburg, BRD
	Rotor-Gene 2000	Corbett Research, Mortlake, Australien
Mischgerät	Duomax 1030	Heidolph, Schwalbach, BRD
Mikroskope	Axioplan 2	Zeiss, Jena, BRD
	Axiocvert 25	Zeiss, Jena, BRD
pH-Meter	pH526	WTW, Weilheim, BRD
Gelfiltrationseinheit	Miniprep cell basic unit	BioRad, München, BRD
Phosphorimager	BAS Reader-2500	Raytest, Straubenhardt, BRD
Schüttelinkubator	Orbital-Shaker	Forma Scientific, Marietta, USA
Sequenziergerät	Li-cor Modell 4000	MWG-Biotech, Teddington, UK
Spektrophotometer	Spektronic Genesys 2	Milton Roy, Rochester, USA
Sterile Werkbänke	Sterilgard Class II	The Baker Company, Sanford, USA
PCR-Hood	Telstar PV-30/70	Labotect, Göttingen, BRD
Temperaturschüttler	Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg, BRD
UV-Beleuchtungskammer	N90LW 366 nm	Konrad Bender, Wiesloch, BRD
UV-Kontaktlampe	Chroma 42	Vetter, Wiesloch, BRD
Vakuumblotter	Vacuum Blotter 270 BR	BioRad, München, BRD
Vakuumpumpe (Dot Blots)		Biometra, Göttingen, BRD
Vermessen radioaktiver Proben	Quick-Count™	Bioscan, Washington, USA
Vortexer	Vortex-Genie 2	Scientific Industries, Bohemia, USA
Westernblotapparatur	Trans-Blot®SD	BioRad, München, BRD
Zentrifugen	Megafuge 1.0R	Heraeus Instruments, Hanau, BRD
	Tischzentrifuge 5417R	Eppendorf, Hamburg, BRD
	Optima XL-100	
	Ultracentrifuge	Beckmann, Palo Alto, USA

5.1.3 Software

AIDA Ver 3.00.	Raytest, Straubenhardt, BRD
geNORM V3.3	Center for Medical Genetics, Ghent, Belgien
HUSAR	Deutsches Krebsforschungszentrum, Heidelberg, BRD
BLAST	National Center for Biotechnology Information, Bethesda, USA
Rotor-Gene Version 5.0.47	Corbett Research, Mortlake, Australien
Microsoft® Excel 2002	Microsoft GmbH, Unterschleißheim, BRD
Microsoft® Word 2002	Microsoft GmbH, Unterschleißheim, BRD
MatInspector	Genomatix Software GmbH, BRD
ElDorado	Genomatix Software GmbH, BRD
BaseImageIR V2.2	Licor Inc., Lincoln, USA

5.1.4 Verbrauchsmaterial

BioImager Platte	BAS SR Imaging Plate	Fujifilm, Düsseldorf, BRD
Elektroporationsküvetten	Gene Pulser I / <i>E. coli</i> Chamber	BioRad, München, BRD
Filmkassetten	X-OMAT-Kassetten	Sigma-Aldrich, Steinheim, BRD
	NTB2	INTEGRA, Fernwald, BRD
Filterpapier	Whatman 3MM	Schleicher & Schuell, Dassel, BRD
Filteraufsatz	0,45 µm, unsteril	Schleicher & Schuell, Dassel, BRD
	0,2 µm, steril	Schleicher & Schuell, Dassel, BRD
PVDF-Membran	Immobilion-P	Millipore, Bedford, USA
Röntgenfilme	X-OMAT	Sigma-Aldrich, Steinheim, BRD
Materialien Zellkultur	6, 10 cm Schalen	Falcon, Gera, BRD
	25 und 75cm Flaschen	BD Biosciences, Bedford, USA

	6, 24, 96-Loch-Platten	Falcon, Gera, BRD
	Chamber Slides	Falcon, Gera, BRD
	Invasionsinserts	Nunc
Pipetten	2, 5 und 10 ml	Greiner, Frickenhausen, BRD
Einfriertubes	2 ml	Greiner, Frickenhausen, BRD
PAA-Gel-Trocknung	Gel Drying Solution	BioRad, München, BRD
	Cellophane Support	BioRad, München, BRD
	Geltrocknungsrahmen	BioRad, München, BRD
Proteinchromatographie	Nickel-NTA-Sepharose	QIAGEN, Hilden, BRD
Säulen zur DNA-und	Quick Spin Columns	Roche, Mannheim, BRD
Proteinreinigung	NAP TM-25 Säulen	Amersham, Upsalla, Schweden
	Mikrokonzentratoren	Millipore, Bedford, USA
Sequenziergel	Rapid Gel XL	
	Solution 40%	USB, Cleveland, USA
Silanisierte Objektträger		Roth, Karlsruhe, BRD
Deckgläschen	24 x 24	Roth, Karlsruhe, BRD
Nylonmembranen	positively charged	Roche, Mannheim, BRD
Westernblot-Detektion	ECL™ Western Blotting	
	Detection Reagents	Amersham, Upsalla, Schweden
	Hyperfilm MP	Amersham, Upsalla, Schweden
PCR-Wachs	Liquid Wax	MJ Research, USA

5.1.5 Kits

Cell Line Nucleofection Kit V	Amaxa Biosystems, Köln, BRD
StreptABC Kit	Dako, Hamburg, BRD
High Pure PCR Product Purification	Roche, Mannheim, BRD
Invisorb Plasmid Maxi Kit	Invitek, Berlin, BRD
QIAprep Spin Mini Kit	QIAGEN, Hilden, BRD
QIAquick Gel Extraction Kit	QIAGEN, Hilden, BRD
Random primed DNA Labelling Kit	Roche, Mannheim, BRD
Riboprobe Combination System-T3/T7	Promega, Madison, USA
SequiTherm EXCEL TM II DNA Sequencing Kit-LC	Epicentre Technologies, Madison, USA
TOPO TA Cloning Kit	Invitrogen, Karlsruhe, BRD

5.1.6 Enzyme

<i>RQ 1 DNase</i>	Promega, Madison, USA
<i>RNasin</i> Ribonuklease Inhibitor	Promega, Madison, USA
<i>Superscript II RNase H⁻ Reverse Transkriptase</i>	GIBCO BRL, Karlsruhe, BRD
AmpliTaQ® DNA-Polymerase	Applied Biosystems, Foster City, USA
AmpliTaQ® Gold DNA-Polymerase	Applied Biosystems, Foster City, USA
Platinum Pfx DNA Polymerase	Invitrogen, Karlsruhe, BRD
T4 DNA Ligase	Boehringer Mannheim, Mannheim, BRD
Proteinase K (10 mg/ml)	Merck, Darmstadt, BRD
<i>RNase A</i>	Sigma-Aldrich, Steinheim, BRD
Benzonase® Nuclease	Novagen, Madison, WI, USA
<i>EcoR</i> I	New England BioLabs, Frankfurt, BRD
<i>Not</i> I	New England BioLabs, Frankfurt, BRD
<i>BamH</i> I	New England BioLabs, Frankfurt, BRD

5.1.7 Antikörper

Primäre Antikörper		
Rabbit anti alpha B crystallin	IgG, aufgereinigt	WAK-Chemie Medical GmbH, Steinbach, BRD
NCL-SCO5 (anti-pct 56)	IgG, aufgereinigt	Novocastra, Newcastle uT, UK
anti-ot 89	Antiserum, polyklonal, aufgereinigt, Kaninchen	Eurogentec, Seraing, Belgien
Sekundäre Antikörper		
Goat-Anti-mouse IgG, HRP-linked antibody		New England BioLabs, Frankfurt, BRD
Goat-Anti-rabbit IgG, HRP-linked antibody		New England BioLabs, Frankfurt, BRD

5.1.8 DNA-, RNA- und Proteinstandards

λ / Hind III	New England BioLabs, Frankfurt, BRD
1kb Leiter	GIBCO BRL, Karlsruhe, BRD
RNA-Leiter	Invitrogen, Karlsruhe, BRD
Pre-stained Protein-Marker (MW)	PeqLab, Erlangen, BRD

5.1.9 Lösungen und Kulturmedien

5.1.9.1 Kultivierung und Lagerung von Bakterien

Luria-Broth-Medium (LB)	10,0 g Bacto-Trypton 5,0 g Bacto-Hefeextrakt 5,0 g Natriumchlorid ad 1,0 l mit A. bidest. pH 7.4 mit 10 N NaOH autoklavieren (20 min, 3 bar, 121 °C) Lagerung bei 4 °C
Agarplatten	LB-Medium unter Zusatz von 1,5 % (w/v) Bacto-Agar autoklavieren (20 min, 3 bar, 121 °C) abkühlen der Lösung auf ca. 50 °C Zufügen der zur Selektion notwendigen Antibiotika Gießen der Platten Lagerung bei 4 °C
SOC-Medium	2,0 g Bacto-Trypton 0,5 g Bacto-Hefeextrakt 1,0 ml 1 M NaCl-Lösung (Endkonzentration 10 mM) 1,0 ml 1 M KCl-Lösung (Endkonzentration 10 mM) ad 1,0 l mit A. bidest. pH 7.0 mit 10 N NaOH autoklavieren (20 min, 3 bar, 121 °C) 1,0 ml 2 M MgCl ₂ -Lösung (Endkonzentration 20 mM) 1,0 ml 2 M Glucose-Lösung (Endkonzentration 20 mM) Lagerung bei 4 °C
Ampicillin (Stammlösung 100 mg/ml), in A. bidest., steril filtrieren, Lagerung bei -20 °C, Einsatz in einer Endkonzentration von 100 µg/ml	
Kanamycin (Stammlösung 30 mg/ml), in A. bidest., steril filtrieren, Lagerung bei -20 °C, Einsatz in einer Endkonzentration von 30 µg/ml	
IPTG (Stammlösung 100 mM), in A. bidest., steril filtrieren, Lagerung bei -20 °C, Einsatz in einer Endkonzentration von 4 mM	
X-Gal (Stammlösung 40 mg/ml), in Dimethylformamid, Lagerung lichtgeschützt bei -20 °C, Einsatz in einer Endkonzentration von 1,6 mg/ml	
IPTG (Stammlösung 1 M), in A. bidest., steril filtrieren, Lagerung bei -20 °C, Endkonzentration abhängig von jeweiligen Induktionsbedingungen	
Glycerin, 50 % (v/v), in A. bidest., steril filtrieren	
10 N NaOH	400g NaOH ad 1,0 l mit A. bidest.
1 M NaCl-Lösung	58,4 g NaCl ad 1,0 l mit A. bidest.
1 M KCl-Lösung	74,5 g NaCl ad 1,0 l mit A. bidest.
2 M MgCl ₂ -Lösung	203,3 g MgCl ₂ x6H ₂ O ad 1,0 l mit A. bidest.
2 M Glucose-Lösung	36,0 g Glucose ad 100,0 ml mit A. bidest.

5.1.9.2 Kultivierung von adhärenenten Säugetierzellen

A-431	90% DMEM+10% FCS
BT 474	90% DMEM+10% FCS
COS 7	90% DMEM+10% FCS
EFM 19	90% RPMI+10% FCS
KS wt	90% DMEM+10% FCS+2mM Glutamax

HT 1080	90% DMEM+10% FCS
MCF 7	90% RPMI+10% FCS
MCF 10a	DMEM/Ham's F12 (1:1)
	5 % Pferdeserum
	1 % Glutamax
	10 µg/ml Insulin
	5 µg/ml Hydrokortison
	20 ng/ml EGF
	100 ng/ml Cholera toxin
MFM 223	85% MEM+15% FCS+2mM Glutamax+1x ITSS
MRP 03 (MM4)	DMEM/Ham's F12 (1:1)
	2% FCS
	10 µg/ml Insulin
	5 ng/ml EGF
	100 ng/ml Hydrokortison
	1 ng/ml Cholera toxin
SKB R3	90% DMEM+10% FCS+2mM Glutamax
Geneticin (G-418-Sulfat)	(Stammlösung 100 mg/ml), in A. bidest., steril filtrieren, Endkonzentration abhängig von jeweiliger Zelllinie
Penicillin-Streptomycin	(Stammlösung 100x), in 1x PBS, steril filtrieren, Einsatz in einer Endkonzentration von 1 %
Trypsin-EDTA-Lösung:	0,125 % Trypsin, 0,125 % EDTA, in 1x PBS, steril filtrieren
Einfriermedium:	6 ml DMEM, 3 ml FCS, 1 ml DMSO (steril filtriert), Lagerung bei -20 °C
Kristallviolett	1 mg/ml, in A. bidest.
Essigsäure	10 % (v/v), in A. bidest.

5.1.9.3 Arbeiten mit DNA

Plasmidpräparation nach Birnboim

Lösung I	5,0 ml 1 M Glucose 2,5 ml 1 M Tris/HCl 2,0 ml 0,5 M EDTA ad 100,0 ml mit A. bidest. => steril filtrieren
Lösung II	5 mg/ml Lysozym => Zugabe vor Verwendung 2,0 ml 10 N NaOH 5,0 ml 20 % SDS ad 100,0 ml mit A. bidest. => frisch ansetzen
Lösung III	60,0 ml 5M Kaliumacetat 11,5 ml Eisessig 28,5 ml A. bidest. => steril filtrieren
1 x TE-Puffer (10 mM Tris-HCl pH 8,0, 1 mM EDTA)	1,0 ml 1 M Tris/HCl pH 8,0 2,0 ml 0,5 M EDTA pH 8,0 ad 100,0 ml mit A. bidest.
1M Tris/HCl pH 8,0	12,1g Tris ad 100,0 ml mit A. bidest. pH 8,0 mit HCl
0,5 M EDTA pH 8,0	18,6g Na ₂ EDTA ad 100,0 ml mit A. bidest. pH 8,0 mit 10 N NaOH
1 M Glucose	18,0 g Glucose ad 100,0 ml A. bidest.
5M Kaliumacetat	4,9 g Kaliumacetat ad 100,0 ml A. bidest.
20 % SDS (w/v)	20,0 g SDS ad 100,0 ml A. bidest.
3M Natriumacetat	24,6 g Natriumacetat ad 100,0 ml mit A. bidest.

pH 5,2 mit Eisessig
 70 % Ethanol 70 ml Ethanol
 ad 100,0 ml mit A. bidest.
 5 mg/ml Lysozym (Stammlösung 100 mg/ml), in A. bidest., steril filtrieren, Endkonzentration abhängig von jeweiliger Zelllinie

Gelelektrophorese

10 x TBE-Puffer 108 g Tris
 55 g Borsäure
 9,5 g EDTA
 ad 1,0 l mit A. bidest.
 pH 7.8 mit HCl
 6 x Gelladepuffer 30 % (v/v) Glycerin
 20 mM Tris-HCl, pH 7.6
 2 mM EDTA
 0,02 % (w/v) Bromphenolblau und Xylenylanol in A. bidest.
 steril filtrieren
 Ethidiumbromid (Stammlösung 10 mg/ml) in A. bidest., steril filtrieren, Lagerung bei 4 °C

Sequenzierung

6 % Sequenziergel 5,25 ml Rapid Gel XL Solution 40%
 14,7 g Harnstoff
 3,5 ml 10x TBE Long Run Buffer
 0,35 ml 99,9 % DMSO
 ad 30,0 ml mit A. bidest.
 filtrieren (0,45 µm Filter)
 Zugabe von 245 µl 10 % APS und 35 µl TEMED
 luftblasenfrei gießen
 1 h bei RT polymerisieren lassen
 10 x TBE-Long-Run-Buffer 162,0 g Tris
 27,5 g Borsäure
 9,3 g EDTA
 ad 1,0 l mit A. bidest.

cDNA-Dot-Blot

0,8 N NaOH 8,0 ml 10 N NaOH
 ad 100,0 ml mit A. bidest.
 10 x Denaturierungslösung (1 N NaOH, 10 mM EDTA)
 10 ml 10 N NaOH
 20 ml 0,5 M EDTA pH 8,0
 ad 100,0 ml mit A. bidest.
 2 x Neutralisierungslösung (1M Natriumphosphat pH 7.5)
 g Natriumphosphat
 ad 100,0 ml mit A. bidest.
 pH 7.5 mit
 Waschlösungen:
 0,5 % SDS 2,5 ml 20 % SDS
 ad 1,0 l mit A. bidest.
 2 x SSC / 0,1 % SDS 100,0 ml 20x SSC
 0,5 ml 20 % SDS
 ad 1,0 l mit A. bidest.
 0,1 x SSC / 0,5 % SDS 5,0 ml 20x SSC
 2,5 ml 20 % SDS
 ad 1,0 l mit A. bidest.
 20 x SSC (3 M NaCl, 0,3 M Natriumcitrat)
 175,0 g NaCl
 88,0 g Natriumcitrat
 ad 1,0 l mit A. bidest.

5.1.9.4 Arbeiten mit RNA

RNA-Extraktion, Gelelektrophorese, Northern-Blot und Hybridisierung

7,5 M Ammoniumacetat	57,8 g Ammoniumacetat ad 100,0 ml mit A. bidest.
20 x MOPS-Puffer	400 mM MOPS 100 mM Natriumacetat 20 mM EDTA pH 7.0 mit 10 N NaOH-Lösung steril filtrieren Lagerung bei 4 °C
RNA-Denaturierungslösung	0,5 µl 20 x MOPS-Puffer 3,5 µl Formaldehyd 10,0 µl Formamid steril filtrieren Lagerung bei -20 °C
6 x RNA-Gelladepuffer	50 % Glycerin 1 mM EDTA, pH 8,0 0,25 % (w/v) Bromphenolblau und Xylenxanol steril filtrieren Lagerung bei -20 °C
Vorhybridisierung (10,0 ml)	5,0 ml Formamid 0,1 ml t-RNA (10 mg/ml) 0,5 ml 20 % SDS 1,2 ml A. bidest. 0,5 ml 1 M NaPP 0,2 ml 50 x Denhardt 2,5 ml 20 x SSC
Hybridisierung (5,0 ml)	2,5 ml Formamid 50,0 µl t-RNA (10 mg/ml) 0,1 ml radioaktiv markierte Probe 0,25 ml 20 % SDS 0,4 ml A. bidest. 0,1 ml 1 M NaPP 0,1 ml 50 x Denhardt 1,25 ml 20 x SSC
1 M NaPP	25,5 ml 1M Na ₂ HPO ₄ 74,5 ml 1M NaH ₂ PO ₄
1M Na ₂ HPO ₄	35,8 g Na ₂ HPO ₄ ad 100,0 ml mit A. bidest.
1M NaH ₂ PO ₄	13,8 g NaH ₂ PO ₄ ad 100,0 ml mit A. bidest.
50 x Denhardt	0,5 g Ficoll 0,5 g Polyvinylpyrrolidone 0,5 g BSA ad 50,0 ml mit A. bidest.

RNA-RNA-in situ-Hybridisierung

0,4 M Natriumhydrogencarbonat	3,36 g Natriumhydrogencarbonat ad 100,0 ml mit A. bidest.
0,6 M Natriumcarbonat	6,36 g Natriumcarbonat ad 100,0 ml mit A. bidest.
Fixierungslösung (4% Paraformaldehyd, 2x SSPE)	20,0 g Paraformaldehyd 1,25 ml 2 M MgCl ₂ einige Tropfen 10 N NaOH 50,0 ml 20 x SSPE ad 500,0 ml mit A. bidest. zum Lösen in Mikrowelle erwärmen Lagerung bei 4 °C

Proteinase K-Behandlung

2x SSC, 1% SDS 10,0 ml 20x SSC
 0,5 ml 20 % SDS
 auf 100,0 ml mit A. bidest.
 5µl Proteinase K (10mg/ml) zugeben

0,1 M Glycin, 2 x SSPE 20,0 ml 1M Glycin
 20,0 ml 20x SSPE
 auf 200,0 ml mit A. bidest.

Acetylierung (2 x SSPE, Triethanolamin, Essigsäureanhydrid)

15,0 ml 20 x SSPE
 2,25 g Triethanolamin
 ad 150,0 ml mit A. bidest.
 2 x 375 µl Essigsäureanhydrid

Hybridisierungslösung

	Stock	Endvolumen 10 ml	Endkonzentration
Deion. Formamid	100%	4,6 ml	50 %
SSPE	20x	1,0 ml	2x
Dextransulfat in 20 % Formamid	50% w/v	2,0 ml	10 % w/v
Tris-Puffer (pH7.5)	1 M	0,1 ml	10 mM
Denhardt	250x	40 µl	1x
t-RNA	10mg/ml	0,5 ml	500 µg/ml
Heringsperma-DNA	10mg/ml	0,1 ml	100 µg/ml
SDS	10%	0,1 ml	0,1 %

Waschlösungen

50 % Formamid, 2 x SSPE 75,0 ml Formamid
 15,0 ml 20 x SSPE
 ad 150,0 ml mit A. bidest.

50 % Formamid, 0,5 x SSC, 0,1 % SDS 75,0 ml Formamid
 3,75 ml 20 x SSC
 750 µl 20 % SDS
 ad 150,0 ml mit A. bidest.

2x SSC, 0,1% SDS, 50µg/ml RNaseA 15,0 ml 20x SSC
 75,0 µl 20 % SDS
 750,0 µl RNase A (10mg/ml)
 ad 150,0 ml mit A. bidest.

Dehydrierungslösungen

50 % Ethanol, 0,3 M Ammoniumacetat 75,0 ml Ethanol
 15,0 ml 3 M Ammoniumacetat
 ad 150,0 ml mit A. bidest.

70 % Ethanol, 0,3 M Ammoniumacetat 105,0 ml Ethanol
 15,0 ml 3 M Ammoniumacetat
 ad 150,0 ml mit A. bidest.

90 % Ethanol, 0,3 M Ammoniumacetat 135,0ml Ethanol
 15,0 ml 3 M Ammoniumacetat
 ad 150,0 ml mit A. bidest.

Fillemulsion 118 ml Fillemulsion, auf 45 °C erwärmen
 Zugabe von 118 ml erwärmten 0,6 M Ammoniumacetat
 vorsichtig (luftblasenfrei) mischen
 20 ml-Aliquots bei 4 °C lichtdicht aufbewahren

20 x SSPE, pH 7.4 175,3 g Natriumchlorid
 27,6 g Natriumhydrogenphosphat
 7,4 g EDTA
 ad 1,0 l mit A. bidest.

1M Glycin	pH 7.4 mit 10 N NaOH 7,5 g Glycin ad 100,0 ml mit A. bidest.
3 M Ammoniumacetat	115,6 g Ammoniumacetat ad 500,0 ml mit A. bidest.
250 x Denhardt	0,5 g Ficoll 0,5 g Polyvinylpyrrolidone 0,5 g BSA ad 10,0 ml mit A. bidest.

5.1.9.5 Arbeiten mit Proteinen

Gelelektrophorese

Lösungen	Trenngel			Sammelgel
	7,5 %	10%	15%	
Acrylamidlösung (30% (w/v)) 29:1 Acrylamid/bisacrylamid	1,24 ml	1,7 ml	2,5 ml	260 µl
4 x Tris-HCl/SDS, pH8,8	1,3 ml	1,3 ml	1,3 ml	-
4 x Tris-HCl/SDS, pH6,8	-	-	-	500 µl
A. bidest.	2,45 ml	2,0 ml	1,2 ml	1,22 ml
10% (w/v) APS	50 µl	50 µl	50 µl	20 µl
TEMED	5 l	5 µl	5 µl	2µl

4 x Tris-HCl/SDS, pH6.8	6,05 g Tris ad 100,0 ml mit A. bidest. pH 6.8 mit HCl filtrieren (0,45 µm Filter) 0,4 g SDS zugeben Lagerung bei 4°C
4 x Tris-HCl/SDS, pH8.8	91 g Tris ad 500,0 ml mit A. bidest. pH 8.8 mit HCl filtrieren (0,45 µm Filter) 2 g SDS zugeben Lagerung bei 4°C
10% (w/v) APS	1g APS ad 10,0 ml mit A. bidest. Lagerung bei -20 °C in 1,0 ml-Aliquots
5 x SDS-Elektrophoresepuffer	15 g Tris 72 g Glycin 5 g SDS ad 1,0 l mit A. bidest. Lagerung bei 4°C
6 x SDS-Probenpuffer	7 ml 4 x Tris-HCl/SDS, pH6,8 3 ml Glycerin 1 g SDS 0,93 g DTT 1.2 mg Bromphenolblau Lagerung bei -20°C
Coomassie-Färbelösung	500,0 ml Methanol 100,0 ml Eisessig 0,2 g Coomassie Brilliantblau G250 ad 1,0 l mit A. bidest
Coomassie-Entfärbelösung	100,0 ml Methanol 70,0 ml Eisessig ad 1,0 l mit A. bidest
Ponceau S Rot	0,5 g Ponceau S 1,0 ml Eisessig ad 100.0 ml mit A. bidest.

Aufreinigung von Proteinen

Puffer A:	6 M Guanidinium-Hydrochlorid, 100 mM NaH ₂ PO ₄ , 10 mM Tris-HCl pH 8.0 28,66 g Guanidinium-Hydrochlorid 0,68 g NaH ₂ PO ₄ 500,0 µl Tris/HCl pH 8.0 ad 50,0 ml mit A. bidest.
Puffer B:	8 M Harnstoff, 100 mM NaH ₂ PO ₄ , 10 mM Tris-HCl, pH 8.0 24,0 g Harnstoff 0,68 g NaH ₂ PO ₄ 500,0 µl Tris/HCl pH 8.0 ad 50,0 ml mit A. bidest. pH 8.0 mit NaOH
Puffer C:	8 M Harnstoff, 100 mM NaH ₂ PO ₄ , 10 mM Tris-HCl, pH 6.3 mit NaOH
Puffer D:	8 M Harnstoff, 100 mM NaH ₂ PO ₄ , 10 mM Tris-HCl, pH 5.9 mit NaOH
Puffer E:	8 M Harnstoff, 100 mM NaH ₂ PO ₄ , 10 mM Tris-HCl, pH 4.5 mit HCl
Puffer F:	6 M Guanidinium-Hydrochlorid, pH 2.5 mit Eisessig 28,66 g Guanidinium-Hydrochlorid ad 50,0 ml mit A. bidest.
Lysepuffer	71,4 µl Complete Stammlösung 428,6 µl 1% SDS
7x Complete Stammlösung: 1 Complete EDTA-fre Protease Inhibitor Cocktail Tablette in 1,5 ml A. bidest lösen	

Western Blot

Transferpuffer	3,1 g Tris (25 mM) 15,01 g Glycine (200 mM) 200,0 ml Methanol (20% (w/v)) ad 1,0 l mit A. bidest.
1 x TBST	100,0 ml 10 x TBS 1,0 ml Tween 20 (0,1 % (w/v)) ad 1,0 l mit A. bidest.
Blockierungslösung	5 g Milchpulver ad 100,0 ml mit 1 x TBST
Erstantikörperlösung	0,5 g BSA 10,0 µl Erstantikörper ad 10,0 ml mit 1 x TBST
Zweitantikörperlösung	0,5 g BSA 1,0 µl Zweitantikörper ad 10,0 ml mit 1 x TBST
10 x TBS	24,2 g Tris (20 mM) 80,0 g Natriumchlorid (500 mM) ad 1,0 l mit A. bidest. pH 7.6 mit HCl
10 x PBS	80,0 g NaCl (130 mM) 2,0 g KCl (2,7 mM) 11,5 g Na ₂ HPO ₄ (48,0 mM) 2,0 g KH ₂ PO ₄ (1,47 mM) ad 1,0 l mit A. bidest.

Immunhistochemie

0,6% Wasserstoffperoxyd/Methanol:	147 ml Methanol (99,8 %) 3 ml Wasserstoffperoxyd (30 %)
-----------------------------------	--

5.1.9.6 Zelllinien

A-431	epidermoides Karzinom, human	DSMZ, Braunschweig, BRD
BT 474	duktales Karzinom der Brust, human	DSMZ, Braunschweig, BRD
COS 7	Nierenkarzinom, Grüne Meerkatze	DSMZ, Braunschweig, BRD
EFM 19	duktales Karzinom, Grad 2 der Brust, human	DSMZ, Braunschweig, BRD
KS wt	duktales Karzinom der Brust, human	B. Gückel, UFK Tübingen, BRD
HT 1080	Fibrosarkom, human	DSMZ, Braunschweig, BRD

MCF 7	Adenokarzinom der Brust, human	DSMZ, Braunschweig, BRD
MCF 10a	fibrozystische Erkrankung der Brust, human	Molekulare Pathologie, Charité, Berlin, BRD
MFM 223	duktales Karzinom, Grad 3 der Brust, human	DSMZ, Braunschweig, BRD
MRP 03	Mammareduktionsplastik, human	eigene Kultivierung
SKB R3	Adenokarzinom der Brust, human	Molekulare Pathologie, Charité, Berlin, BRD

5.1.9.7 Bakterienstämme

JM101	F' traD36 proA ⁺ proB ⁺ lacIq Δ(lacZ)M15 Δ(lac-proAB) supE thi-1 λ- [Yanisch-Perron et al., 1985]
JM109	recA1 supE44 endA1 hsdR17 gyrA96 relA1 thi Δ (lac-proAB) [Yanisch-Perron et al., 1985]
TOP10F ⁻	F- mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ80lacZΔM15 ΔlacX74 recA1 deoR araD139Δ (ara-leu)7697 galU galK rpsL (StrR) endA1 nupG Invitrogen GmbH, Karlsruhe, BRD
BL21(DE3)	F- ompT hsdSB(rB mB) gal dcm (DE3) Novagen, Madison, WI, USA

5.1.9.8 cDNA-Klone

Als Ausgangsmaterial für die Echtzeit-PCR und die Synthese der PCR-Produkte für die cDNA Dot Blots wurden cDNA-Klone, erhältlich vom IMAGE-Konsortium, verwendet. Die angegebenen Homologien der cDNA-Klone mit den aufgeführten Genbankzugriffsnummern und Datenbankeinträgen entsprechen einem Abgleich mit der Datenbank des NCBI aus dem Jahr 2001.

Tabelle 13: In dieser Arbeit verwendete cDNA-Klone.

Gen ID	GenBank Acc. No.	Vektor	Insert-Größe	Homologie
bn 10/1	H40218	pT7T3D	1591 bp	unbekannt
bn 10/2	R11704	Lafmid BA	1055 bp	unbekannt
bn 11	H59984	pT7T3D	2211 bp	Acc U94855 Homo sapiens translation initiation factor 3, 47kDa subunit mRNA
bn 18	R48405	pT7T3D	1537 bp	Acc Z22865 Homo sapiens dermatopontin mRNA
bn 22	AA134750	pT7T3D – Pac	1304 bp	Acc. XM_043134 Homo sapiens hypothetical protein MGC10848, mRNA
bn 34/1	W20436	pT7T3D	1498 bp	unbekannt
bn 34/2	AI017773	pT7T3D – Pac	685 bp	Acc M18415 Alpha-2a Adrenergic Receptor (Human)
bn 39	H39889	pT7T3D	1946 bp	Acc XM_006294 Homo sapiens crystalline, alpha B (CRYAB) mRNA
bn 43/1	W24714	pT7T3D	851 bp	Acc AF036144 Homo sapiens meningioma-expressed antigen 5 (MEA5) mRNA
bn 43/2	AA507428	pT7T3D – Pac	3355 bp	Acc AF036144 Homo sapiens meningioma-expressed antigen 5 (MEA5) mRNA
bn 48/1	W40455	pT7T3D	1375 bp	Acc AJ243191 Homo sapiens mRNA for cardiovascular heat shock protein
bn 48/2	AA397963	pT7T3D – Pac	964 bp	Acc AJ243191 Homo sapiens mRNA for cardiovascular heat shock protein
bn 103/1	AA441817	pT7T3D – Pac	unbekannt	Acc XM_051629 Homo sapiens Fibulin 2 (FBLN2) mRNA
bn 103/2	AI538998	pCMV – SPORT 6	2664 bp	Acc XM_051629 Homo sapiens Fibulin 2 (FBLN2) mRNA
on 8/1	AI569988	pCMV – SPORT 6	3586 bp	Acc AF272357 Homo sapiens Neural Proliferation Differen-tiation and Control Protein 1-like protein (NPDC1)
on 8/2	AA609522	pT7T3D – Pac	943 bp	Acc AF272357 Homo sapiens Neural Proliferation Differen-tiation and Control Protein 1-like protein (NPDC1)

Gen ID	GenBank Acc. No.	Vektor	Insert-Größe	Homologie
on 8/3	AA435740	pT7T3D – Pac	752 bp	Acc AF272357 Homo sapiens Neural Proliferation Differen-tiation and Control Protein 1-like protein (NPDC1)
on 18/1	AA632135	pT7T3D – Pac	2376 bp	unbekannt
on 18/2	R59231	Lafmid BA	2036 bp	unbekannt
on 27/1	AA054776	pT7T3D – Pac	928 bp	Acc AF125348 Homo sapiens Caveolin 1 (Cav1)
on 27/2	AA148902	pT7T3D – Pac	unbekannt	Acc AF125348 Homo sapiens Caveolin 1 (Cav1)
on 27/3	N34192	pT7T3D	2151 bp	Acc AF125348 Homo sapiens Caveolin 1 (Cav1)
on 31/1	AA029385	pT7T3D	1036 bp	unbekannt
on 31/2	H22492	pT7T3D	1312 bp	unbekannt
pct 56/1	AA486673	pBlueskript SK-	unbekannt	Acc XM_052014 Homo sapiens polymeric immunoglobulin receptor (PIGR) mRNA
pct 56/2	H24673	pT7T3D	941 bp	Acc XM_052014 Homo sapiens polymeric immunoglobulin receptor (PIGR) mRNA
pct 56/3	AI697470	pCMV – SPORT 6	4229 bp	Acc XM_052014 Homo sapiens polymeric immunoglobulin receptor (PIGR) mRNA
umn 46/1	W78778	pT7T3D	754 bp	Acc J04164 Human Interferon-inducible Protein 9-27 mRNA
umn 46/2	W77866	pT7T3D	751 bp	Acc J04164 Human Interferon-inducible Protein 9-27 mRNA
umn 46/3	AI784408	pCMV – SPORT 6	1973 bp	Acc J04164 Human Interferon-inducible Protein 9-27 mRNA
bt 6/1	AA449553	pT7T3D – Pac	unbekannt	Acc AF144700 Homo sapiens small zinc finger-like protein (TIM13) mRNA
bt 6/2	AA688139	pT7T3D – Pac	510 bp	Acc AF144700 Homo sapiens small zinc finger-like protein (TIM13) mRNA
bt 6/3	AI793289	pT7T3D – Pac	1986 bp	Acc AF144700 Homo sapiens small zinc finger-like protein (TIM13) mRNA Acc M94363 Human Lamin B2 (LAMB2)
bt 11/1	AA622024	pT7T3D – Pac	855 bp	Acc XM_034183 Homo sapiens macrophage capping protein mRNA
bt 11/2	H45766	pT7T3D	2229 bp	Acc XM_034183 Homo sapiens macrophage capping protein mRNA
ot 58/1	N77192	pT7T3D	1686 bp	Acc M24070 Human DNA-binding Protein B (dbpB)
ot 58/2	AA113417	pBlueskript SK-	1377 bp	Acc M24070 Human DNA-binding Protein B (dbpB)
ot 59/1	AA171458	pBlueskript SK-	unbekannt	Acc NM_003406 Homo sapiens tyrosine 3-monooxygenase /tryptophan 5 –monooxygenase activation protein, zeta poly-peptide (YWHAZ) mRNA
ot 59/2	AA100745	pBlueskript SK-	unbekannt	Acc NM_003406 Homo sapiens tyrosine 3-monooxygenase /tryptophan 5 –monooxygenase activation protein, zeta poly-peptide (YWHAZ) mRNA
ot 59/3	N28626	pT7T3D	3826 bp	Acc NM_003406 Homo sapiens tyrosine 3-monooxygenase /tryptophan 5 – monooxygenase activation protein, zeta poly-peptide (YWHAZ) mRNA
ot 89/1	AI208938	pT7T3D – Pac	unbekannt	Acc XM_012051 Homo sapiens similar to fatty acid binding protein 5 (psoriasis-associated); E-FABP mRNA
ot 89/2	H58270	pT7T3D	1654 bp	Acc XM_012051 Homo sapiens similar to fatty acid binding protein 5 (psoriasis-associated); E-FABP mRNA

Vektoren

Klonierungsvektor für die Haushaltsgene war pCRII TOPO (Invitrogen, Karlsruhe, BRD) (Abb. 22).

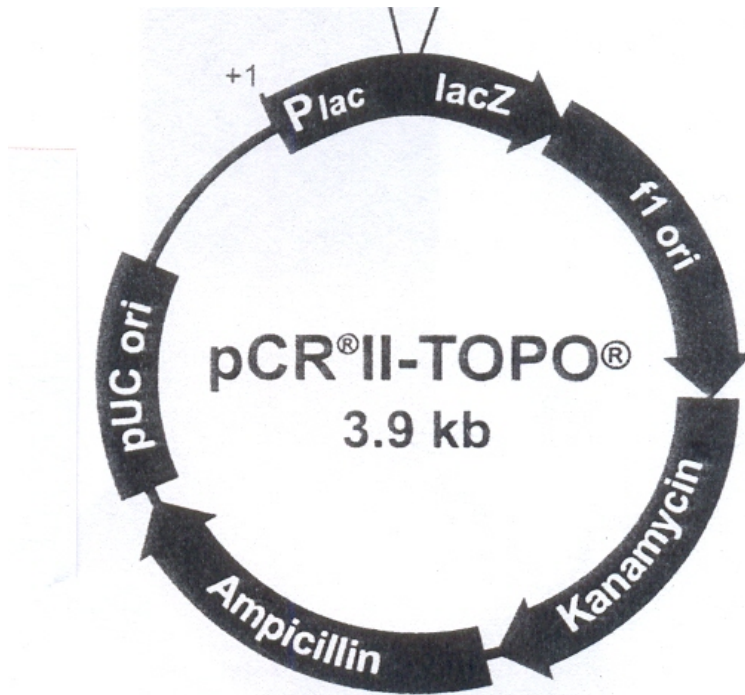


Abbildung 22: Vektorkarte von pCRII TOPO.

Für RNA-RNA-*in situ*-Hybridisierungen wurde der Vektor pBK-CMV (Stratagene) verwendet (Abb. 23). Als Klonierungsvektor für die Expression in Zelllinien wurde der Vektor pBK-CMVΔ benutzt. Dafür wurde der *lac*-Promotor (bp 1184 – 1305) und das β -Galactosidase α -Fragment (bp 812 – 1183) durch Behandlung mit den Restriktionsenzymen *Spe* I und *Nhe* I (entfernter Bereich bp 1097 – 1305) aus dem Ursprungsvektor pBK-CMV entfernt.

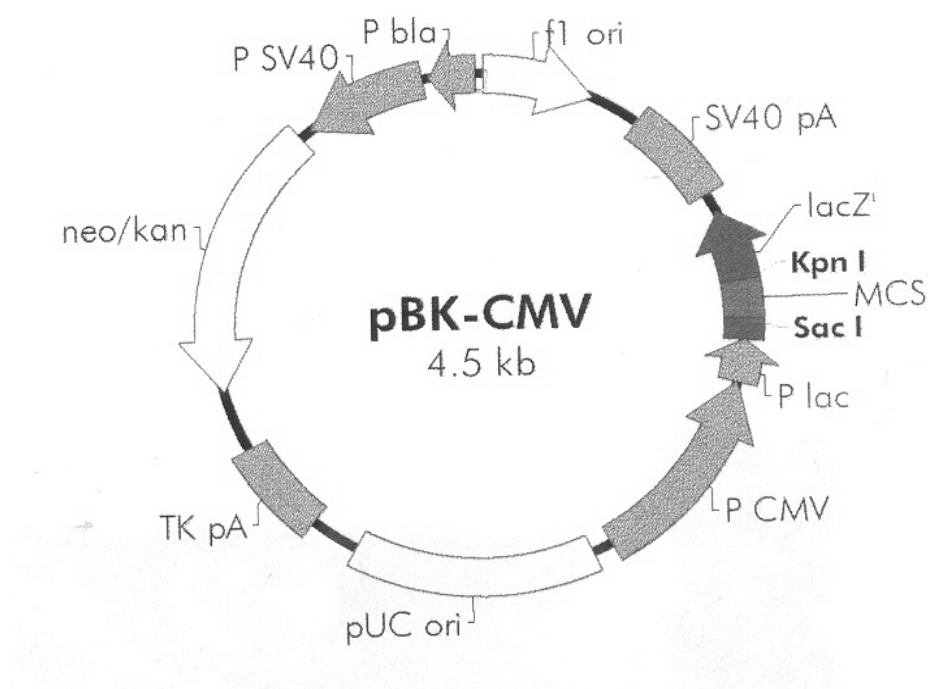


Abbildung 23: Vektorkarte von pBK-CMV.

Zur Positivkontrolle von Transfektionen in Zelllinien wurde der modifizierte Vektor pEGFP-1 (BD Biosciences Clontech, Bedford, USA) verwendet (Abb. 24). Die Modifikation besteht in der Klonierung des CMV-Promotors in die Multiple Cloning Site des Vektors pEGFP-1

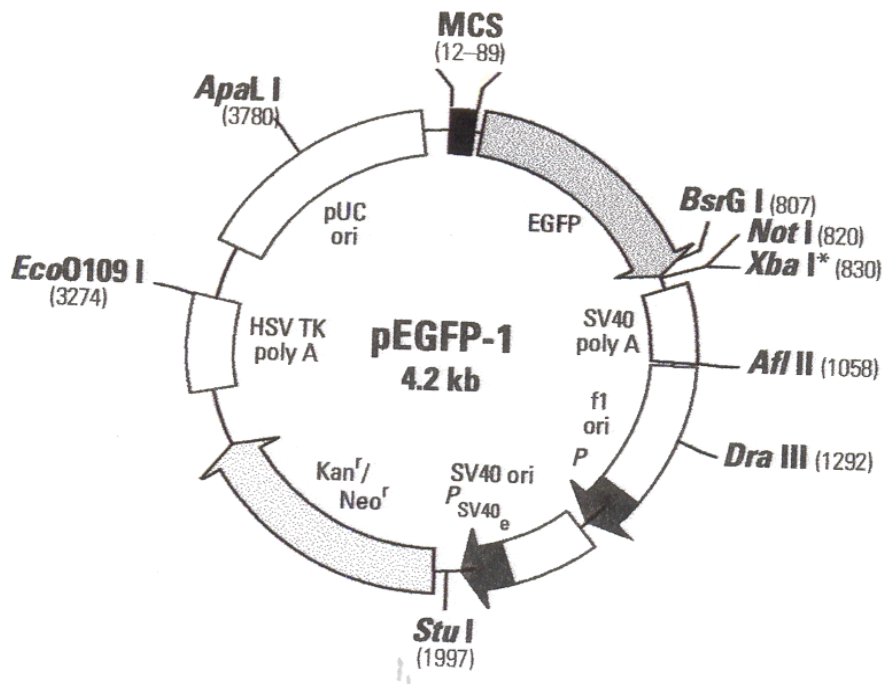


Abbildung 24: Vektorkarte von pEGFP-1.

Für die Proteinexpression in Bakterien wurden alle offenen Leserahmen in den Vektor pET 29a (Novagen, Madison, WI, USA) kloniert (Abb. 25).

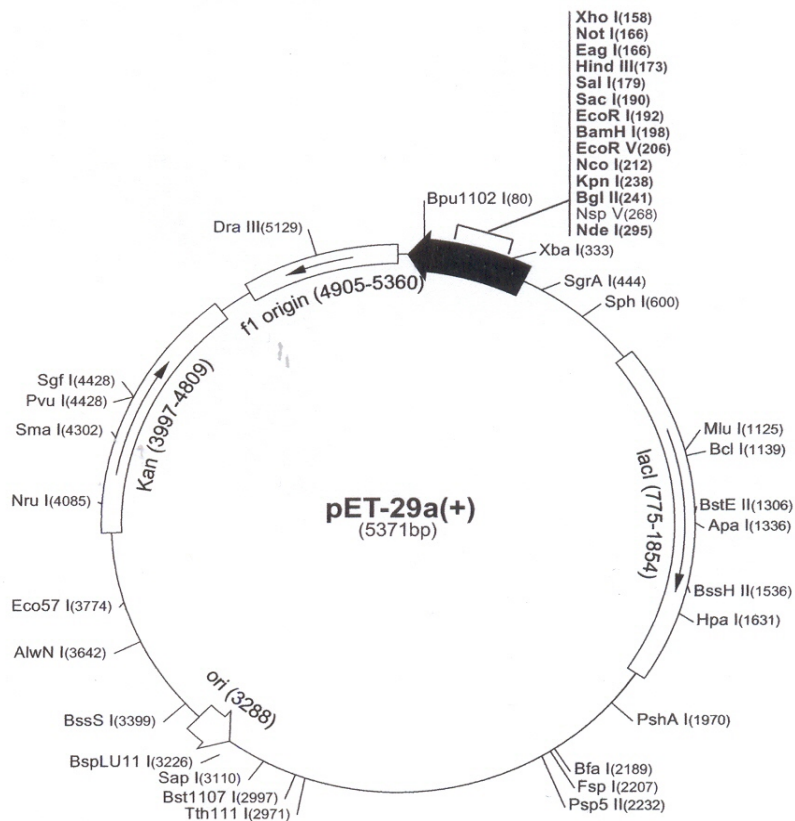


Abbildung 25: Vektorkarte von pET 29a.

5.1.9.9 Oligonukleotide

Alle in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide wurden von Thermo Elektron Corporation, Berlin, BRD synthetisiert.

Primer für cDNA Dot Blot und Echtzeit-PCR

Die Herstellung der PCR-Produkte für die cDNA Dot Blots und Echtzeit-PCR erfolgte an den oben aufgeführten cDNA-Klonen (5.1.9.8) mit optimal gewählten Primern (HUSAR) innerhalb der bekannten Sequenz dieser cDNA-Klone. Die Länge des PCR-Produktes sollte zwischen 150 – 250 bp betragen, die Schmelztemperatur der Primer um 60,0 °C liegen und die sie sollten zwischen 19 und 21 bp lang sein. Für die zur Normalisierung eingesetzten Haushaltsgene wurden die verwendeten Primer anhand von Literaturangaben beziehungsweise eines aktuellen Datenbankeintrages gewählt.

Tabelle 14: Primer für cDNA-Dot Blot und real time PCR.

Name Primer	Sequenz Primer	Gen ID cDNA-Klon	Bindungs-stelle im cDNA-Klon	Länge PCR- Produkt
bn 10/1 fw	5'- CAG AGA GAA GCA ACT GCG C -3'	bn 10/2	82 → 100	197 bp
bn 10/1 rev	5'- AGC TTC TTG TCG CTC TCC AG -3'		278 → 259	
bn 11/1 fw	5'- CTC CAG CCT CAT CCT CAG AC -3'	bn 11/1	91 → 110	189 bp
bn 11/1 rev	5'- CTG TCC ACA ATG GAG GCC -3'		279 → 262	
bn 11/2 fw	5'- TGC AGC AAG TAG GAG GGG -3'	bn 11/1	71 → 88	184 bp
bn 11/2 rev	5'- TTG CTG TTG AGC ATG GTC TC -3'		254 → 235	
bn 18/1 fw	5'- AGC TAC CAG TGT CCC CAG G -3'	bn 18/1	165 → 183	181 bp
bn 18/1 rev	5'- AGC ACG TCT GGT ACC ATT CC -3'		345 → 326	
bn 18/2 fw	5'- TGT CGC TAC AGC AAG AGG TG -3'	bn 18/1	23 → 42	181 bp
bn 18/2 rev	5'- CAG TCA TCC GGC ACA TTA TG -3'		203 → 184	
bn 22/1 fw	5'- TCT ACA TTG CCA ACA GCG AG -3'	bn 22/1	229 → 248	221 bp
bn 22/1 rev	5'- CCG TTT GTA AAT CTT CCT TTG C -3'		449 → 428	
bn 34/1 fw	5'- CTG TCA TTA GCA ACA TGT GCT G -3'	bn 34/1	42 → 63	197 bp
bn 34/1 rev	5'- AAA ATG TGT CCT TTC CCC C -3'		238 → 219	
bn 39/1 fw	5'- ATT TGG GCC TGC CCT TAG -3'	bn 39/1	11 → 28	187 bp
bn 39/1 rev	5'-ACA GGT CTC TGG CCC TGA G -3'		197 → 179	
bn 43/1 fw	5'- GCA GAT AGT CGG CAG GAC TC -3'	bn 43/2	29 → 48	197 bp
bn 43/1 rev	5'- CTC AAA GCC CAC AAT GGT G -3'		225 → 207	
bn 43/2 fw	5'- TGA GTT TTC CTC AGT TTT CTC G -3'	bn 43/2	100 → 121	168 bp
bn 43/2 rev	5'- ACA GTC ACC TGT GAC CAG ACC -3'		267 → 247	
bn 48/1 fw	5'- GAC CTT CCA TCA GCC TTA ACC -3'	bn 48/1	102 → 122	159 bp
bn 48/1 rev	5'- TGA CCA GAG AGG CAT GGA G -3'		260 → 242	
bn 48/2 fw	5'- CCT CTA CCA GCC TCC AAG C -3'	bn 48/1	110 → 128	151 bp
bn 48/2 rev	5'- TTC ATG CAG TTT ATC ACG AAC C -3'		260 → 239	
bn 103/1 fw	5'- ACA TGT TCG CGT GTC TCT TG -3'	bn 103/2	192 → 211	181 bp
bn 103/1 rev	5'- TGC TGA CTT GAC TCC TGT GG -3'		372 → 353	
bn 103/2 fw	5'- AGT GTG TTC ACA CAG TGC TCG -3'	bn 103/1	352 → 372	177 bp
bn 103/2 rev	5'- TAC CTG CAA AGA CAA TGG ACC -3'		528 → 508	
on 8/1 fw	5'- CAG GTC ATG GCA GTG CAG -3'	on 8/1	340 → 357	214 bp
on 8/1 rev	5'- ACC AGA TGC TGT GCT GGA G -3'		553 → 535	
on 8/2 fw	5'- TGG ACT GTG CCC TGA AGA G -3'	on 8/1	219 → 237	208 bp
on 8/2 rev	5'- GTT GAT TGT CCA GAC TCC TTC C -3'		426 → 405	
on 18/2 neu fw	5'- AAT GAT GAA GGC AAT CTG GC -3'	on 18/2	245 → 264	202 bp
on 18/2 neu rev	5'- CTG GGA TGG CCA TTG AAG -3'		446 → 429	
on 27/1 neu fw	5'- AAT CCA AGC ATC CCT TTG C -3'	on 27/1	236 → 254	197 bp
on 27/1 neu rev	5'- GCA GAA TCA CAA TAT GAG CAG G -3'		432 → 411	
on 27/2 neu fw	5'- CCT TTT AAT TTT CCT GGT GCC -3'	on 27/2	85 → 105	232 bp
on 27/2 neu rev	5'- AGC CAA TAA AGC GAT GGT TG -3'		316 → 297	
on 31/1 fw	5'- TAC CTG ATT TCC AAC ACC AGC -3'	on 31/2	9 → 29	239 bp
on 31/1 rev	5'- TTT GCA AGA AGT TCA CAG CG -3'		247 → 228	
on 31/2 fw	5'- CAA AGC ACT TCA CCT TTC TGG -3'	on 31/2	403 → 423	226 bp
on 31/2 rev	5'- TGA TGA GAG GCC AGG AGC -3'		628 → 611	

Name Primer	Sequenz Primer	Gen ID cDNA-Klon	Bindungs-stelle im cDNA-Klon	Länge PCR- Produkt
pct 56/1 fw	5'-TGC TAC TAC CCA CCC ACC TC -3'	pct 56/3	298 → 317	218 bp
pct 56/1 rev	5'- AGG CCA CAC TTG TAG CGC -3'		515 → 498	
pct 56/2 fw	5'- AGC GAG GGG TGG GTT TAA G -3'	pct 56/3	431 → 448	239 bp
pct 56/2 rev	5'- ACC TTG AGA GTC TCT CCC AGC -3'		669 → 649	
pct 56/3 fw	5'- GAC TTC CTG CTC CAG TCC AG -3'	pct 56/3	413 → 432	170 bp
pct 56/3 rev	5'- GCA GGT GTT AGA GCA GGG AG -3'		582 → 563	
umn 46/2 fw	5'- ATG TCG TCT GGT CCC TGT TC -3'	umn 46/2	243 → 262	181 bp
umn 46/2 rev	5'- ATG AGG ATG CCC AGA ATC AG -3'		423 → 404	
bf 6/1 fw	5'- CAT GGA CCG CTA CAT GGA C -3'	bt 6/3	219 → 237	212 bp
bf 6/1 rev	5'- CAC AGT CCC GTC TGT CCC -3'		430 → 413	
bt 11/1 fw	5'- GGG GGA CTC CTA CCT AGT GC -3'	bt 11/2	181 → 200	223 bp
bt 11/1 rev	5'- TTC CTG GTA CTT GAG GCC C -3'		403 → 385	
bt 11/2 fw	5'- CCT GAG GAA GAC CTC ACA GC -3'	bt 11/2	152 → 171	218 bp
bt 11/2 rev	5'- TGC CGC TCC TTC TCA TTC -3'		369 → 352	
ot 58/1 fw	5'- CAT CGC AAC GAA GGT TTT G -3'	ot 58/1	279 → 297	161 bp
ot 58/1 rev	5'- CTC TCC ATC TCC TAC ACT GCG -3'		439 → 419	
ot 58/2 fw	5'- TGA GTA AAT GCC GGC TTA CC -3'	ot 58/1	114 → 133	183 bp
ot 58/2 rev	5'- AAA AAC CCC ATG CTG CAT AG -3'		296 → 277	
ot 59/1 fw	5'- GCG ATA TGA TGA CAT GGC AG -3'	ot 59/1	51 → 70	198 bp
ot 59/1 rev	5'- CTG TAT TCT CGA GCC ATC TGC -3'		248 → 228	
ot 59/2 fw	5'- GAA ATC AGC AAA AAG GAA ATG C -3'	ot 59/1	60 → 81	232 bp
ot 59/2 rev	5'- CCG ATG TCC ACA ATG TCA AG -3'		291 → 272	
ot 89/1 fw	5'- GTT CAG CAG CTG GAA GGA AG -3'	ot 89/2	1 → 20	243 bp
ot 89/1 rev	5'- CTG AGT TTT TCT GCC ATC AGC -3'		243 → 223	
β-Aktin fw	5'- GGA CTT CGA GCA AGA TAT GG -3'	β-Aktin	724 → 1017	298 bp
β-Aktin rev	5'- GCA GTG ATC TCC TTC TGC ATC -3'			
β-Katenin fw	5'- TTC CAC GAC TAG TTC AGT TGC -3'	β-Katenin	1654 → 2030	377 bp
β-Katenin rev	5'- AAC AGC AGC TGC ATA TGT CG -3'			
β-2-Mikro. fw	5'- CCT GAA TTG CTA TGT GTC TGG GTT TCA TCC A -3'	β-2-Mikro.	139 → 580	445 bp
β-2-Mikro. rev	5'- GGA GCA ACC TGC TCA GAT ACA TCA AAC ATG G -3'			
basic prot. fw	5'- CAA GCG GAT GAA CAC CAA C -3'	basic prot.	194 → 212	210 bp
basic prot. rev	5'- AGA CGC ACG ACC TTG AGG -3'		403 → 386	
GAPDH fw	5'- GGT GAA GGT CGG AGT CAA CG -3'	GAPDH	70 → 566	500 bp
GAPDH rev	5'- CAA AGT TGT CAT GGA TGA CC -3'			
HPRT neu fw	5'- ACG AAG TGT TGG ATA TAA GC -3'	HPRT	592 → 611	213 bp
HPRT neu rev	5'- ATA ATT TTA CTG GCG ATG TC -3'		805 → 786	
ot 59/2 fw	5'- GAA ATC AGC AAA AAG GAA ATG C -3'	ot 59/1	60 → 81	232 bp
ot 59/2 rev	5'- CCG ATG TCC ACA ATG TCA AG -3'		291 → 272	
rib. Prot. fw	5'- TCA AAT TTA CCC TGG CCA AG -3'	rib. Prot.	172 → 191	210 bp
rib. Prot. rev	5'- TGA AGA CCT GGG TCT GCA G -3'		381 → 363	
Tubulin fw	5'- GTG TCC AGA TTG GCA ATG C -3'	Tubulin	35 → 53	250 bp
Tubulin rev	5'- TTG CCT GTG ATG AGT TGC TC -3'		284 → 265	

Klonierung

Tabelle 15: Primer zur Klonierung der PCR-Produkte der Haushaltsgene für cDNA-Dot Blot und Echtzeit-PCR.

Name Primer	Sequenz Primer	Länge PCR- Produkt	Quelle
β-Aktin fw	5'- GGA CTT CGA GCA AGA TAT GG -3'	298 bp	Battaglia, M. et al. 1998
β-Aktin rev	5'- GCA GTG ATC TCC TTC TGC ATC -3'		

Name Primer	Sequenz Primer	Länge PCR-Produkt	Quelle
β-Katenin fw	5'- TTC CAC GAC TAG TTC AGT TGC -3'	377 bp	Wasserman, L. et al. 1999
β-Katenin rev	5'- AAC AGC AGC TGC ATA TGT CG -3'		
β-2-Mikro fw	5'- CCT GAA TTG CTA TGT GTC TGG GTT TCA TCC A -3'	445 bp	Goeminne, J-C. et al. 1999
β-2-Mikro rev	5'- GGA GCA ACC TGC TCA GAT ACA TCA AAC ATG G -3'		
basic prot fw	5'- CAA GCG GAT GAA CAC CAA C -3'	210 bp	Datenbankabgleich HUSAR
basic prot rev	5'- AGA CGC ACG ACC TTG AGG -3'		
GAPDH fw	5'- GGT GAA GGT CGG AGT CAA CG -3'	500 bp	Datenbankabgleich HUSAR
GAPDH rev	5'- CAA AGT TGT CAT GGA TGA CC -3'		
HPRT neu fw	5'- ACG AAG TGT TGG ATA TAA GC -3'	109 bp	Datenbankabgleich HUSAR
HPRT neu rev	5'- ATA ATT TTA CTG GCG ATG TC -3'		
PL A2 fw	5'- GAA ATC AGC AAA AAG GAA ATG C -3'	232 bp	Datenbankabgleich HUSAR
PL A2 rev	5'- CCG ATG TCC ACA ATG TCA AG -3'		
rib. Prot. fw	5'- TCA AAT TTA CCC TGG CCA AG -3'	210 bp	Datenbankabgleich HUSAR
rib. Prot. rev	5'- TGA AGA CCT GGG TCT GCA G -3'		
Tubulin fw	5'- GTG TCC AGA TTG GCA ATG C -3'	250 bp	Datenbankabgleich HUSAR
Tubulin rev	5'- TTG CCT GTG ATG AGT TGC TC -3'		

Tabelle 16: Primer für die Klonierung der 6 Kandidatengene in die Expressionsvektoren pBK-CMV (RNA-RNA-*in situ*-Hybridisierung) und pBK-CMVΔ (Expression in Zelllinien).

Name Primer	Sequenz Primer	Spaltstelle, Start-, Stopcodon
bn22pETpBKpCR BamHI fw	5'- CGC GGG ATC CAT GCT CCT GCT GCT GGG G -3'	<i>Bam</i> HI, mit Startcodon
bn22pBK NotI rev	5'- ATA GTT TAG CGG CCG CTC ACT GTC CTT CAT GCA C -3'	<i>Not</i> I, mit Stopcodon
bn39pETpBKpCR BamHI fw	5'- CGG AAT TCA TGG ACA TCG CCA TCC ACC A -3'	<i>Eco</i> RI, mit Startcodon
bn39pBK NotI rev	5'- ATA GTT TAG CGG CCG CTC ATT TCT TGG GGG CTG CGG -3'	<i>Not</i> I, mit Stopcodon
pct56pETpBKpCR BamHI fw	5'- CGG AAT TCA TGC TGC TCT TCG TGC TCA C -3'	<i>Eco</i> RI, mit Startcodon
pct56 pBK NotI rev	5'- ATA GTT TAG CGG CCG CCT AGG CTT CCT GGG GGC CGT -3'	<i>Not</i> I, mit Stopcodon
bt11pETpBKpCR BamHI fw	5'- CGG AAT TCA TGT ACA CAG CCA TTC CC -3'	<i>Eco</i> RI, mit Startcodon
bt11pBK NotI rev	5'- ATA GTT TAG CGG CCG CTC ATT TCC AGT CCT TGA A -3'	<i>Not</i> I, mit Stopcodon
ot59pETpBKpCR BamHI fw	5'- CGG AAT TCA TGG ATA AAA ATG AGC TGG T -3'	<i>Eco</i> RI, mit Startcodon
ot59pBK NotI rev	5'- ATA GTT TAG CGG CCG CTT AAT TTT CCC CTC CTT CTC -3'	<i>Not</i> I, mit Stopcodon
ot89pETpBKpCR BamHI fw	5'- CGG GAT CCA TGG CCA CAG TTC AGC AG -3'	<i>Bam</i> HI, mit Startcodon
ot89pBK NotI rev	5'- ATA GTT TAG CGG CCG CTT ATT CTA CTT TTT CAT -3'	<i>Not</i> I, mit Stopcodon

Tabelle 17: Primer für die Klonierung der 6 Kandidatengene in den Expressionsvektor pET 29a (Expression rekombinanter Proteine in Bakterien).

Name Primer	Sequenz Primer	Spaltstelle, Start-, Stopcodon
bn22pETpBKpCR BamHI fw	5'- CGC GGG ATC CAT GCT CCT GCT GCT GGG G -3'	<i>Bam</i> HI, mit Startcodon
bn22pET NotI rev	5'-ATA GTT TAG CGG CCG CCT GTC CTT CAT GCA CTT G -3'	<i>Not</i> I, ohne Stopcodon
bn39pETpBKpCR BamHI fw	5'- CGG AAT TCA TGG ACA TCG CCA TCC ACC A -3'	<i>Eco</i> RI, mit Startcodon
bn39pET NotI rev	5'-ATA GTT TAG CGG CCG Ctt tct tgg ggg ctg cgg -3'	<i>Not</i> I, ohne Stopcodon
pct56pETpBKpCR BamHI fw	5'- CGG AAT TCA TGC TGC TCT TCG TGC TCA C -3'	<i>Eco</i> RI, mit Startcodon
pct56pET NotI rev	5'-ATA GTT TAG CGG CCG Cgg ett cct ggg ggc cgt -3'	<i>Not</i> I, ohne Stopcodon
bt11pETpBKpCR	5'- CGG AAT TCA TGT ACA CAG CCA TTC CC -3'	<i>Eco</i> RI, mit Startcodon

Name Primer	Sequenz Primer	Spaltstelle, Start-, Stopcodon
BamHI fw		
bt11pET NotI rev	5'-ATA GTT TAG CGG CCG CTT TCC AGT CCT TGA AAA A -'3	<i>Not I</i> , ohne Stopcodon
ot59pETpBKpCR BamHI fw	5'- CGG AAT TCA TGG ATA AAA ATG AGC TGG T -'3	<i>Eco RI</i> , mit Startcodon
ot59pET NotI rev	5'-ATA GTT TAG CGG CCG Cat ttt ccc ctc ctt ctc -'3	<i>Not I</i> , ohne Stopcodon
ot89pETpBKpCR BamHI fw	5'- CGG GAT CCA TGG CCA CAG TTC AGC AG -'3	<i>Bam HI</i> , mit Startcodon
ot89pET NotI rev	5'-ATA GTT TAG CGG CCG CTT CTA CTT TTT CAT AGA T -'3	<i>Not I</i> , ohne Stopcodon

Sequenzierung

Tabelle 18: Zur Sequenzierung verwendete Primer

Name Primer	Sequenz Primer
M13uni	5'- TGT AAA ACG ACG GCC AGT -'3
M13rev	5'- CAG GAA ACA GCT ATG ACC -'3
pBKrev	5'- ATG TCG TAA CAA CTC CGC -'3
bn22uni1	5'- TGC AAC CAG AGT GTG GTG GT -'3
bn22rev1	5'- CTG TAG TAC AAC AAG CCA GG -'3
bn22uni2	5'- ACC ACC ACA CTC TGG TTG CA -'3
bn22rev2	5'- AAG CTG GTG GAC AGG AAG CT -'3

Reverse Transkription

CDS-Primer: 5'- AAG CAG TGG TAA CAA CGC AGA GTA CTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TVN -'3. Die Sequenz des CDS-Primers wurde vom Atlas™ cDNA Expression Arrays User Manual übernommen.

5.1.9.10 Klinische Proben

Das für die Untersuchungen verwendete Biopsiematerial stammt aus der in der AG Gynäkologische Molekularbiologie angelegten Tumorbank. Die Biopsien wurden in der Frauenklinik der FSU Jena entnommen. Das Material wurde sofort nach Entnahme in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur weiteren Bearbeitung bei -80 °C gelagert. Zum Anfertigen von Gefrierschnitten wurden die Biopsien in Einbettmedium eingebettet und in der Dampfphase von flüssigem Stickstoff langsam gefroren. Für diese Arbeit wurden Biopsien von Mammakarzinomen und Mamma Normalgeweben verwendet. Die Normalgewebe stammen aus den Resektionsrand der entfernten Tumore. Alle Gewebeproben wurden durch einen Pathologen untersucht und die Histologie, der Tumorgrad und TNM-Status diagnostiziert. In den verwendeten Normalgeweben wurden keine Krebszellen gefunden.

Tabelle 19: : Tumorbanknummer, Histologie, Grad und TNM-Status der Tumore zu den in dieser Arbeit verwendeten Normalgeweben.

Nummer	Tumor
N1	Histo Grad TNM invasiv duktales partiell apokrin differenziertes Karzinom + EIC 2 pT2C4 L0 V0 pN0C4 M0C2
N2	Histo Grad TNM invasiv duktales Karzinom 2 pT2C4 pN1biiiC4 M0C2
N4	Histo Grad TNM multifokales invasiv duktales Karzinom mit extensiver intraduktales Komponente 3 pT2(m)C4 pN0C4 M0C2
N5	Histo Grad TNM DCIS 1 /
N6	Histo Grad TNM invasiv duktales Karzinom 2 pT1cC4 pN0C4 M0C2
N7	Histo intraduktales Karzinom vom Komedotyp mit fokaler minimaler Stromainvasion

Nummer	Tumor	
	Grad	1
	TNM	pT1aC4 pN0C3 M0C3
N16	Histo	invasiv duktales Karzinom
	Grad	3
	TNM	ypT2C4 pN0C4 M0C2

Tabelle 20: : Tumorbanknummer, Histologie, Grad und TNM-Status der in dieser Arbeit verwendeten Tumore.

TB-Nr.	Tumor	
40T	Histo	invasiv duktales Karzinom
	Grad	2
	TNM	pT2 pN1 M0C1
43T	Histo	invasiv lobuläres Karzinom
	Grad	2
	TNM	/
75 T	Histo	invasiv duktales Karzinom
	Grad	2
	TNM	pT4bC4 pN1biiiC4 M0C2
78Ta	Histo	invasiv duktales Karzinom
	Grad	3
	TNM	pT1cC4 pN0C4 M0C2
80T	Histo	invasiv duktales Karzinom
	Grad	2
	TNM	pT2C4 pN1biiC4 M0C1
101T	Histo	invasiv duktales Karzinom
	Grad	2
	TNM	pT1cC4 pN0C4 M0C2
102T	Histo	invasiv duktales Karzinom
	Grad	3
	TNM	pT2(m)C4 pN1biC4 M0C2
123T	Histo	lobuläres Karzinom
	Grad	x
	TNM	pT2(m)C4 pN1biiiC4 M0C2
140T	Histo	invasiv duktales Karzinom
	Grad	2
	TNM	pT1bC4 pN0C4 M0C2
151T	Histo	invasiv duktales Karzinom
	Grad	3
	TNM	pT2(m)C4 pN3C4 M0C2
153T	Histo	multizentrisches invasiv lobuläres Karzinom
	Grad	3
	TNM	pT1c(m)C4 pN2C4 M1C2
179Ta	Histo	invasiv duktales Karzinom
	Grad	3
	TNM	pT2C4 pN1C4 M0C2
289T	Histo	multifokales und flächenhaft wachsendes intraduktales Karzinom vom Komedotyp, herdförmig beginnende Infiltration
	Grad	3
	TNM	pT1aC4 pN0C4 M0C2
322T	Histo	invasives Karzinom vom Mischtyp, hauptsächlich gering differenziertes invasiv duktales Karzinom und lobuläres Karzinom
	Grad	3
	TNM	pT2C4 pN0C4 M0C2
331T	Histo	intraduktales Karzinom
	Grad	x
	TNM	/
360T	Histo	invasiv duktales Karzinom + DCIS
	Grad	2
	TNM	pT2(m)C4 pN0C4 M0C2

TB-Nr.	Tumor	
397T	Histo Grad TNM	invas. duktales Karzinom 2 pT1c(m) C4 pN0C4 M0C2
463T	Histo Grad TNM	invasiv duktales Karzinom 2 pT1bC4 pN0C4 M0C2
520T	Histo Grad TNM	invasiv duktales Karzinom 2 pT1cC4 pN0C4 M0C2
545T	Histo Grad TNM	invasiv duktales Karzinom 2 pT1bC4 pN0C4 M0C1
546T	Histo Grad TNM	invasiv duktales Karzinom 3 pT1cC4 pN1biiiC4 M0C2
547T	Histo Grad TNM	invasiv duktales Karzinom 3 pT1cC4 pN0C4 M0C2
552T	Histo Grad TNM	invasiv duktales Karzinom 3 pT1c(m)C4 pN0C4 M0C2
619T	Histo Grad TNM	metaplastisches Karzinom 3 pT3C4 pN1biC4 M0C2
620T	Histo Grad TNM	invasiv duktales Karzinom 2 pT1cC4 pN0C4 M0C2
624T	Histo Grad TNM	tubuläres Karzinom 1 pT1cC4 pN1aC4 M0C2
637T	Histo Grad TNM	invasiv duktales Karzinom 2 ypT3C4 pN1biiC4 M0C2
638T	Histo Grad TNM	DCIS, Übergang in invasiv duktales Karzinom 1 pT1a(m)C4 pN0C4 M0C2
670T	Histo Grad TNM	scirrhöses, invasiv duktales Karzinom 3 pT2C4 pN1aC4 M0C2
809T	Histo Grad TNM	invasiv duktales Karzinom 2 ypT2C4 pN0C4 M0C2
843T	Histo Grad TNM	invasiv duktales Karzinom 2 pT2C4 pN1C4 M0C2
927T	Histo Grad TNM	invasiv duktales Karzinom 3 pT1cC4 pN0C4 M0C2
980T	Histo Grad TNM	multifokales, invasiv duktales Karzinom 2 pT1c(m)C4 pN1biiC4 M0C1
1049T	Histo Grad TNM	atypisches medulläres Karzinom 3 pT2C4 pN0C4 M0C2
1186T	Histo Grad TNM	invasiv lobuläres Karzinom 3 pT2C4 pN0C1 M0C2
1377T	Histo Grad TNM	invasiv duktales Karzinom, dominierende intraduktale Komponente 3 pT3C4 pN1biC4 M0C2

TB-Nr.	Tumor	
3504T	Histo Grad TNM	invas. duktales Karzinom 3 pT1bC4 pN1biiiC4 M0C2
3512T	Histo Grad TNM	invas. wachs. multifokales Ca vom Mischtyp 3 pT4b(m)C4 pN1biiiC4 M1C2
3558T	Histo Grad TNM	invasiv duktales Karzinom 2 pT1bC4 pN0C4 M0C1
3566T	Histo Grad TNM	multifokales invasiv lobuläres Karzinom 2 pT1c(m) pN1biiiC4 M0C2
3589T	Histo Grad TNM	invasiv duktales Karzinom 3 pT1cC4 pN0C4 M0C2
3590T	Histo Grad TNM	invasiv lobuläres Karzinom 2 pT1cC4 pN0C4 M0C2
3658T	Histo Grad TNM	multifokales invasiv duktales Karzinom 2 pT4b(m)C4 pN1biC4 M0C2
3775T	Histo Grad TNM	invasiv lobuläres Karzinom 2 pT1cC4 L0 V0 pN0C4 Mx
3821T	Histo Grad TNM	vorwiegend kribirform-muzinöses Karzinom / pT2(m)C4 pN0C4 M0C2

5.2 Ergebnisse von Echtzeit-PCR und cDNA-Dot-Blot

Tabelle 21: Zusammenfassung der mittels Echtzeit-PCR ermittelten Expressionsdaten für die untersuchten Tumorsuppressorgene bn 10 bis bn 48.

	bn 10	bn 11	bn 18	bn 22	bn 34	bn 39	bn 43	bn 48
75 T	0,90	3,19	0,05	0,02	1,40	0,02	0,58	0,03
78 Ta	0,81	2,59	0,02	0,03	1,19		0,33	2,61
101 T	1,32	10,47	0,61	0,15	4,54	0,15	1,98	0,16
151 T	1,36	7,04	1,31	0,10	1,81	0,12	1,18	1,99
179 Ta	2,51	2,89	0,62		1,56	0,22	0,92	1,88
520 T		2,62	1,37	0,13	0,87	0,24	2,14	0,20
545 T		0,51			0,43			0,30
546 T	1,53	6,36	1,14	1,34	2,81		3,22	0,21
547 T	2,26	7,87	0,50	0,30	2,69	0,11	0,93	0,31
552 T	1,04			0,06	1,63	4,70	1,31	0,30
619 T		1,24	0,12		1,10			0,05
620 T	1,06	5,61		0,11	1,09			0,23
637 T		1,42			0,96			0,20
670 T	1,19	61,30	1,07	0,13	2,70	0,03	0,94	0,15
809 T		0,63			1,39			0,08
843 T		0,26			2,03			0,58
927 T		21,13			1,11			0,34
980 T		16,41			0,34			0,23
1049 T		0,41			1,14			0,19
MW	1,40	8,44	0,68	0,24	1,62	0,70	1,35	0,53

Dargestellt ist die veränderte Genexpression in den Tumoren gegenüber dem RNA-Gemisch der Normalgewebe. Farblich hervorgehoben ist die Stärke der Regulation der Genexpression. Orange dargestellt ist eine mehr als 2fache, Rot eine mehr als 4fache und Dunkelrot eine mehr als 8fache Heraufregulation. Hellblau dargestellt ist eine mehr als 2fache, Blau eine mehr als 4fache und Dunkelblau eine mehr als 8fache Herunterregulation.

Tabelle 22: Zusammenfassung der mittels Echtzeit-PCR ermittelten Expressionsdaten für die untersuchten Tumorsuppressorgene bn 103 bis umn 46.

	bn 103	on 8	on 18	on 27	on 31	pct 56	umn 46
75 T	0,06			0,14	0,24	0,34	
78 Ta	1,45			0,29	0,78	0,80	
101 T	1,11			0,33	0,65	0,24	
151 T	1,26			0,13	1,25	0,33	
179 Ta	0,28			0,25	1,06	1,57	36,52
520 T				0,63	2,23	2,98	19,30
545 T				0,24	0,72	0,43	5,24
546 T				4,79	2,66	1,17	
547 T				0,42	1,78	0,99	
552 T	1,73			0,20	0,33	0,16	
619 T				0,19	0,41	0,06	5,25
620 T	1,62			0,16	0,97	0,23	
637 T				0,33	0,55	0,20	7,03
670 T	2,85			1,25	1,01	2,01	
809 T				0,06	0,63	0,12	2,38
843 T				0,45	0,57	0,02	11,04
927 T				0,34	0,25	0,14	7,14

	bn 103	on 8	on 18	on 27	on 31	pct 56	umn 46
980 T				0,19	0,55	0,43	2,69
1049 T				0,62	0,42	0,01	5,66
MW	1,29			0,58	0,90	0,64	10,23

Dargestellt ist die veränderte Genexpression in den Tumoren gegenüber dem RNA-Gemisch der Normalgewebe.

Tabelle 23: Zusammenfassung der mittels Echtzeit-PCR ermittelten Expressionsdaten für die untersuchten Onkogene bt 6 bis ot 89.

	bt 6	bt 11	ot 58	ot 59	ot 89
75 T	1,20		1,06		0,34
78 Ta	0,25		3,79		3,82
101 T	1,47		1,94		1,62
151 T	2,54		2,82		1,34
179 Ta	1,23		2,36		3,35
520 T	2,23		1,11		1,20
545 T	1,08	3,82	0,18	0,79	0,22
546 T	3,19		3,65		9,15
547 T	1,55		2,41		2,31
552 T	0,29		3,48		5,22
619 T	2,45	4,71	1,37	3,31	1,93
620 T	1,67		1,43		1,70
637 T	0,85	4,98	0,44	3,00	0,32
670 T	1,82		1,32		1,15
809 T	1,63	4,02	0,31	9,18	0,46
843 T	1,69	9,63	1,59	4,14	1,78
927 T		7,42	2,02	5,59	2,18
980 T	0,57	6,56	0,38	1,67	0,43
1049 T	2,47	4,76	0,96	2,60	0,59
MW	1,56	5,74	1,72	3,79	2,06

Dargestellt ist die veränderte Genexpression in den Tumoren gegenüber dem RNA-Gemisch der Normalgewebe.

Tabelle 24: Zusammenfassung der mittels cDNA-Dot-Blot ermittelten Expressionsdaten für die untersuchten Tumorsuppressorgene bn 10 bis bn 48.

	bn 10	bn 11	bn 18	bn 22	bn 34	bn 39	bn 43	bn 48
40 T	0,35	0,28	0,08	0,02	0,23	0,03	0,29	0,73
43 T	0,07	0,13	0,07		0,30	0,02	0,25	0,60
75 T	31,09	1,54	0,23	0,30	0,63	0,00	0,73	0,06
78 Ta	37,59	0,97	0,51	0,22	0,54	0,10	0,39	0,16
101 T	24,72	1,51	0,30	0,32	3,00	0,04	0,61	0,22
151 T	0,72	0,34	0,21		0,75	0,09	0,77	3,65
179 Ta	29,39	0,54	0,66	0,14	0,58	0,03	0,27	0,52
526 T	1,28	1,56	0,84	0,46	0,22	0,33	0,55	0,24
545 T	1,22	0,43	0,19	0,27	0,57	0,06	1,24	2,17
546 T	0,60	0,01	0,30	0,07		0,01		
547 T	0,43	0,55	0,43	0,41	0,35	0,34	0,40	0,60
552 T	0,06	0,42	0,13	0,00		1,60	0,51	1,42
619 T	0,82	0,27	0,16	0,09	0,60	0,27	0,55	0,70
620 T	0,47	0,44	0,55	0,23	0,23	0,21	0,61	1,56

	bn 10	bn 11	bn 18	bn 22	bn 34	bn 39	bn 43	bn 48
637 T	0,89	0,35	1,29	1,70	0,48	0,04	0,74	2,07
670 T	0,20	2,51	1,09	0,80	1,30	0,08	0,46	0,31
809 T	0,86	0,31	0,33	0,09	1,54	0,02	0,37	0,48
843 T	1,87	0,71	0,29	0,41	1,08	0,09	0,98	2,28
927 T	1,16	0,70		0,28	0,95	0,23	1,11	0,73
980 T	1,39	0,56	0,26	0,04	2,43	0,13	0,87	0,90
1049 T	0,90	0,80	0,26	0,43	0,75	0,05		1,57
MW	6,48	0,71	0,41	0,33	0,87	0,18	0,62	1,05

Dargestellt ist die veränderte Genexpression in den Tumoren gegenüber dem RNA-Gemisch der Normalgewebe.

Tabelle 25: Zusammenfassung der mittels Echtzeit-PCR ermittelten Expressionsdaten für die untersuchten Tumorsuppressorgene bn 103 bis umn 46.

	bn 103	on 8	on 18	on 27	on 31	pct 56	umn 46
40 T	0,28	0,33	0,35	0,11	0,18	0,03	0,60
43 T	0,13	0,47	0,27	0,06	0,20	0,04	0,92
75 T	0,36	1,06	0,31	1,14	0,22	0,07	0,00
78 Ta	1,10	0,50	0,19	0,86	0,20	0,04	0,04
101 T	1,30	0,78	0,61	1,57	0,21	0,03	0,03
151 T	0,73	1,83	0,41	0,48	0,80	0,11	5,93
179 Ta	0,37	0,54	0,19	0,44	0,28	0,02	0,03
526 T	0,34	0,56	3,46	0,68	0,13	1,11	0,51
545 T	0,46	2,38	1,33	0,82	0,95	0,30	2,35
546 T	0,07	0,08	0,02	0,00	0,08	1,62	
547 T	0,22	0,25	0,40	0,24	0,12	0,27	0,20
552 T	0,74	0,30	0,68	0,18	0,37	0,07	1,49
619 T	0,45	0,85	0,93	0,55	0,53	0,02	0,55
620 T	0,66	0,49	0,54	1,00	0,65	0,05	1,84
637 T	0,74	0,83	0,86	0,49	0,64	0,18	1,91
670 T	0,68	0,66	8,73	0,95	0,23	0,46	0,31
809 T	0,28	0,56	0,97	0,25	0,29	0,03	0,38
843 T	0,47	2,98	1,02	0,52	1,14	0,12	4,24
927 T	0,22	0,56	0,76	0,38	0,66	0,13	0,61
980 T	0,34	0,80	0,48	0,69	1,04		0,97
1049 T	0,47	0,89	0,96	0,41	0,65	0,08	1,22
MW	0,50	0,84	1,12	0,56	0,46	0,24	1,21

Dargestellt ist die veränderte Genexpression in den Tumoren gegenüber dem RNA-Gemisch der Normalgewebe.

Tabelle 26: Zusammenfassung der mittels Echtzeit-PCR ermittelten Expressionsdaten für die untersuchten Onkogene bt 6 bis ot 89.

	bt 6	bt 11	ot 58	ot 59	ot 89
40 T	0,64	0,87	0,34	0,27	0,16
43 T	1,10	0,19	0,56	0,59	0,12
75 T	1,61	1,22	18,62	1,18	1,76
78 Ta	0,88	1,14	13,24	0,51	0,87
101 T	3,42	2,22	5,72	0,35	0,55
151 T	2,05	1,70	0,96	0,55	0,39
179 Ta	0,74	1,24	7,97	0,33	0,76

	bt 6	bt 11	ot 58	ot 59	ot 89
526 T	3,30	1,96	1,47	0,67	0,99
545 T	0,84	0,85	0,63	2,44	0,79
546 T	0,11	0,65	2,84	0,20	
547 T	1,63	0,71	0,99	0,27	0,40
552 T	1,15	4,27	0,90	0,53	0,84
619 T	0,84	1,01	1,03	1,51	0,95
620 T	1,30	1,72	0,42	0,37	0,48
637 T	0,52	1,70	0,48	0,65	0,50
670 T	4,69	2,16	1,86	0,66	0,85
809 T	0,90	1,07	0,48	1,12	0,29
843 T	1,22	2,13	1,07	0,72	0,69
927 T	1,28	1,76	0,58	0,72	0,75
980 T	1,29	1,38	0,90	1,60	
1049 T	1,81	0,98	0,86	1,05	0,83
MW	1,49	1,47	2,95	0,78	0,68

Dargestellt ist die veränderte Genexpression in den Tumoren gegenüber dem RNA-Gemisch der Normalgewebe.

5.3 Abkürzungsverzeichnis

-	negativer Wachstumseffekt
Ω	Ohm
%	Prozent
+	positiver Wachstumseffekt
↑	Gen im Mammakarzinom herauf reguliert
↓	Gen im Mammakarzinom herunter reguliert
↓↑	Regulation des Gens im Mammakarzinom nicht eindeutig
°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
2-D-Gelelektrophorese	Zweidimensionale Gelelektrophorese
4-HNE	4-Hydroxynonenal
5-LO/FLAP	<i>5-lipoxygenase/5-lipoxygenase-activating protein</i>
A. bidest	bidestilliertes Wasser
Abb.	Abbildung
ag	Attogramm
AML1/3	<i>Acute myelogenous leukemia 1/3</i>
APS	Ammoniumpersulfat
Arnt	<i>Aryl hydrocarbon Nuclear Receptor Translocator</i>
AS	Aminosäure
Asp	Asparagin
BL	Bakterienlysat
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
BMBF	Bundesministerium für Bildung, Wissenschaft, Forschung und Technologie
bp	Basenpaar
BRCA1/2	breast cancer susceptibility gene-1/2
BSA	Rinderserumalbumin
b-zip	basic leucine zipper
bzw	beziehungsweise
c	Konzentration
ca.	cirka
Ca ²⁺	Kalziumionen
cDNA	komplementäre DNA
CDX-1	<i>Caudal-Related Homeodomain-1</i>
CGH	Komparative genomische Hybridisierung
cm ²	Quadratcentimeter
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CP2	Poly(C)-binding protein-2
CPBP	<i>core promoter binding protein</i>
CpG-Inseln	Cytosin-Guanosin-Inseln
C-terminal	Carboxterminal
DAPI	4,6-Diamidino-2-phenylindoldihydrochlorid
DART	<i>Domain Architecture Retrieval Tool</i>
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dbEST	<i>database of EST's</i> - EST-Datenbank
DCIS	duktales Carcinoma in situ
dCTP	Desoxycytosintriphosphat
dGTP	Desoxyguanintriphosphat
dIgA	dimeres Immunglobulin A
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DTT	Dithiotreitol
dTTP	Desoxytyrosintriphosphat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
E47	<i>basic helix-loop-helix transcription factor</i>
E4BP4	<i>Adenovirus E4 promoter-binding protein/nuclear factor</i>

E-Box	<i>enhancer box</i> – Verstärker-Box
E-Cadherin	epitheliales Cadherin
ECM	extrazelluläre Matrix
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGFP	enhanced green fluorescent protein
EGFR	Epidermaler Wachstumsfaktor Rezeptor
EGR1	<i>early growth response 1</i>
ELISA	<i>Enzyme linked Immuno Sorbant Assay</i> - Enzym-gekoppelter Immunabsorbtionstest
en-1	<i>Engrailed-1</i>
ER	Östrogenrezeptor
ERBB2	= HER-2
ERE	Östrogenantwortelement
EST	<i>expressed sequence tag</i>
Evi1	<i>ecotropic viral integration site 1</i>
F	Konzentration an Nukleinsäuren, bei welcher OD ₂₆₀ =1
FABP5	Fettsäurebindendes Protein 5
FCS	fötales Kälberserum
FISH	<i>Fluorescence in situ hybridisation</i>
FKHRL1	<i>forkhead transcription factor in rhabdomyosarcoma like-1</i>
FOXO1	<i>Forkhead box O-1 transcription factor</i>
g	Gravitation
GAPDH	Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GATA3	GATA bindendes Protein 3
GC-Gehalt	Guanin-Cytosin-Gehalt
Gen-ID	Genidentifikationsnummer
Gly	Glycin
h	Stunde
H ₂ O	Wasser
HdAc	Histondeacetylierung
HE-Färbung	Hämatoxin-Eosin-Färbung
HER-2	<i>epidermal growth factor receptor 2</i>
Hg	Druck in mm Quecksilbersäule
His-Tag	Histidin-Anhang
HMX3	Homeoboxgen 3
Hox1.3	Homeoboxgen 1.3
HOXB7	Homeoboxgen B7
HPRT	Hypoxanthin Phosphoribosyl Transferase 1
HRP	Meerrettichperoxidase
HSP20	Hitzeschockprotein 20
HUSAR	<i>Heidelberg Unix Sequence Analysis Resources</i>
i	induziert
IFN-γ	Interferon-γ
IgA	Immunglobulin A
IL-4	Interleukin-4
IMAGE	<i>Integrated Molecular Analysis of Genomes and their Expression</i>
IPTG	Isoprpyl-1-thio-β-D-galaktosid
ISRE	<i>IFN-stimulated response element</i>
ITI	<i>inter-alpha trypsin</i>
ITIH5	<i>inter-alpha trypsin inhibitor heavy chain precursor 5</i>
k. E.	kein Wachstumseffekt
kb	Kilobase
kDa	Kilodalton
KLF3	<i>krueppel-like factor 3</i>
kV	Kilovolt
lacI	Laktoserepressor
LB-Medium	Luria-Bertani-Medium
LBP	Lipidbindende Proteine
LCIS	lobuläres <i>Carcinoma in situ</i>
LIMK	LIM Kinase (LIM = Akronym für die drei Genprodukte Lin-11, Isl-1, und Mec-3)
LOH	<i>Loss of heterozygosity</i>
M	Genexpressionsstabilität
m	molar

mA	Milliampere
MAPK	mitogen aktivierten Proteinkinase
MAPKAPK2	MAPK-aktivierte Proteinkinase 2
MAZ	<i>MYC-associated zinc finger protein</i>
mBar	MilliBar
Me	DNA-Hypermethylierung
Meis1	<i>myeloid ecotropic viral integration site 1 homolog</i>
mF	Millifarad
Mg	Milligramm
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MIDAS	Metallionen-abhängige Adhäsionsstelle
min	Minute
mJ	MilliJoule
MKK6	Mitogen-aktivierte Proteinkinase Kinase 6
ml	Milliliter
MLH1	<i>DNA mismatch repair (MMR) gene, MutL homolog</i>
mm	Millimeter
MMP	Metallomatrixprotein
MOPS	Morpholinopropansulfonsäure
MPLC	Medium Pressure Liquid Chromatography Anlage
mRNA	<i>messengerRNA</i> - BotenRNA
MSH2	<i>DNA mismatch repair (MMR) gene, MutS homolog2</i>
Mut	Mutation
MW	Molekulargewicht
Myt1	Myelin Transkriptionsfaktor 1
N	Mamma Normalgewebe
n. d.	nicht durchgeführt
Na ₂ CO ₃	Natriumkarbonat
NaHCO ₃	Natriumhydrogenkarbonat
NaPP	Natriumpyrophosphat
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
ng	Nanogramm
Ngn1	Neurogenin 1
ni	nicht induziert
Nkx 2.5/Csx	cardiac muscle-specific homeobox protein
nm	Nanometer
NMP4	<i>nuclear matrix protein 4</i>
N-terminal	Aminoterminal
nur	<i>nuclear receptor</i>
OD	optische Dichte
OG	Onkogen
ORF	offener Leserahmen
PAX	<i>paired box multigene family</i>
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
Pbx1	Homeobox Transkriptionsfaktor
PCR	Polymerasekettenreaktion
PDGF	<i>platelet-derived growth factor</i>
pg	Picogramm
pH-Wert	<i>potentia Hydrogenii</i> -Wert
pIgM	polymeres Immunglobulin M
PIGR	polymerer Immunglobulinrezeptor
PKB/Akt	Proteinkinase B
PLC γ	Phospholipase C γ
pmol	Picomol
PPM1D	<i>protein phosphatase magnesium-dependent 1 delta</i>
Pro	Prolin
ProDom	<i>Proteindomain</i>
PSL	Grad der Schwärzung
PTEN	<i>phosphatase and tension homolog deleted on chromosome 10</i>
PVDF	<i>5-ring polyvinylidene fluoride</i>
RA	Retinolsäure
RAR	Retinolsäurerezeptor

RARE	Retinolsäureantwortelement
rATP	Riboadenosintriphosphat
rCTP	Ribocytosintriphosphat
rGTP	Riboguanosintriphosphat
RNA	Ribonukleinsäure
RPS6KB1	<i>ribosomal protein S6 kinase</i>
rRNA	ribosomale RNA
RT	Raumtemperatur
RTK	Rezeptortyrosinkinasen
RT-PCR	Reverse Transkriptions Polymerasekettenreaktion
rUTP	Ribouridintriphosphat
RXR	Retinol-X-Rezeptor
s	Sekunde
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacryamidgelelektrophorese
Ser	Serin
SIX1	Homeoboxgen Six1
SN	<i>Sample Number</i> - Probennummer
SP1	Stimulatorisches Protein 1
SRY	<i>sex-determining region Y</i>
SSC	<i>sodium saline citrate</i>
STABW	Standardabweichung
STAT	<i>signal transducer and activator of transcription</i>
STK1	Serum Thymidinkinase 1
T	Mammakarzinom
Tab	Tabelle
TBE	Tris-Borat-EDTA
TB-Nr	Tumorbanknummer
TBS	<i>Tris buffered saline</i>
TBX 2	T-box Gen 2
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TE-Puffer	Tris-EDTA-Puffer
TIEG1	<i>Transforming growth factor beta-inducible early gene 1</i>
TIGR	<i>The Institute for Genomic Research</i>
T _m	Schmelztemperatur
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α
Tris	Tris-Hydroxymethylethylenmethan
tRNA	transferRNA
TSG	Tumorsuppressorgen
TSG-6	<i>tumor necrosis factor stimulated gene 6</i>
Tween 20	Polyoxyethylensorbitan
U	Unit
U/min	Umdrehungen pro Minute
UICC	<i>International Union Against Cancer</i>
ün	über Nacht
USF	<i>upstream stimulatory factor</i>
UTR	untranslatierte Region
UV	Ultraviolett
V	Volt
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>
Vf	Verdünnungsfaktor
VIT	<i>vault protein inter-alpha-trypsin</i>
vWA	<i>von Willebrand factor type A</i>
W	Watt
WST-1	4-[3-(4-Iodophenyl)-2-(4-Nitrophenyl)-2H-5-Tetrazolium]-1,3-Benzen Disulfonat
z. B.	zum Beispiel
λ	Absorption

5.4 Literaturverzeichnis

Albini A, Iwamoto Y, Kleinman HK, et al.: A rapid in vitro assay for quantitating the invasive potential of tumor cells. *Cancer Res.* 1987, 47:3239-3245.

Arbeitsgemeinschaft Bevölkerungsbezogener Krebsregister in Deutschland. Krebs in Deutschland. 2. aktualisierte Ausgabe, Saarbrücken, 1999.

Asch HL, Head K, Dong Y, et al: Widespread loss of gelsolin in breast cancers of humans, mice, and rats. *Cancer Res.* 1996, 56:4841-4845.

Barnes GL, Javed A, Waller SM, Kamal MH, Hebert KE, Hassan MQ, Bellahcene A, Van Wijnen AJ, Young MF, Lian JB, Stein GS, Gerstenfeld LC: Osteoblast-related transcription factors Runx2 (Cbfa1/AML3) and MSX2 mediate the expression of bone sialoprotein in human metastatic breast cancer cells. *Cancer Res.* 2003 May 15;63(10):2631-7.

Battaglia M, Pedrazzoli P, Palermo B, et al.: Epithelial tumour cell detection and the unsolved problems of nested RT-PCR: a new sensitive one step method without false positive results. *Bone Marrow Transplantation.* 1998, 22:693- 698.

Bennaars-Eiden A, Higgins L, Hertzell AV, Kapphahn RJ, Ferrington DA, Bernlohr DA: Covalent modification of epithelial fatty acid-binding protein by 4-hydroxynonenal in vitro and in vivo. Evidence for a role in antioxidant biology. *J Biol Chem.* 2002 Dec 27;277(52):50693-702. Epub 2002 Oct 16.

Bieche I, Champeme MH, Lidereau R: Loss and gain of distinct regions of chromosome 1 q in primary breast cancer. *Clin Cancer Res.* 1995, Jan; 1(1):123-7.

Bieche I, Khodja A, Lidereau R: Deletion mapping of chromosomal region 1 p32-pter in primary breast cancer. *Genes, Chromosomes and Cancer.* 1999, 24:255-263.

Birkenfeld J, Betz H, Roth D: Identification of cofilin and LIM-domain-containing protein kinase 1 as novel interaction partners of 14-3-3 zeta. *Biochem J.* 2003 Jan 1;369(Pt 1):45-54.

Birnboim HC, Doly J: A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* 1979 Nov 24;7(6):1513-23.

BLAST: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>

Bos JL: Ras oncogenes in human cancer: a review. *Cancer Res.* 1989, 49:4682.

Bost F, Diarra-Mehrpour M, Martin J: Inter-alpha-trypsin inhibitor proteoglycan family. *Eur. J. Biochem.* 1998, 179:147-154.

Bracete AM, Mertz LM, Fox DK: Isolation of Total RNA from Small Quantities of Tissue and Cells *Focus.* 1999, 21(2):

Bradford MM: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976 May 7;72:248-54.

Cardiff RD, Moghanaki D, Jensen RA: Genetically engineered mouse models of mammary intraepithelial neoplasia. *J Mammary Gland Biol Neoplasia.* 2000 Oct;5(4):421-37.

Castellucci M, Theelen T, Pompili E, Fumagalli L, Renzis GD, Muhlhauser J: Immunohistochemical localization of serine-protease inhibitors in the human placenta. *Cell Tissue Res.* 1994, 278:283-289.

Chan P, Risler J, Raguenez G, Salier J: The three heavy-chain precursors for the inter-alpha-inhibitor family in mouse: new members of the multicopper oxidase protein group with differential transcription in liver and brain. *Biochem J.* 1995, 306:505-512.

Chapin SJ, Enrich C, Aroeti B, Havel RJ, Mostov KE: Calmodulin binds to the basolateral targeting signal of the polymeric immunoglobulin receptor. *J Biol Chem.* 1996, 271(3):1336-1342.

Chen L, Mao S, Larsen W: Identification of a factor in fetal bovine serum that stabilizes the cumulus extracellular matrix. A role for a member of the inter-alpha-trypsin inhibitor family. *J. Biol. Chem.* 1992, 267:12380-12386.

Coletta RD, Jedlicka P, Gutierrez-Hartmann A, Ford HL: Transcriptional Control of the Cell Cycle in Mammary Gland Development and Tumorigenesis. *J. Mam Gland Biol Neoplasia.* 2004, Jan;9(1):39-53.

- Colombatti A**, Bonaldo P: The superfamily of proteins with von Willebrand factor type A-like domains: one theme common to components of extracellular matrix, hemostasis, cellular adhesion, and defense mechanisms. *Blood*. 1991, 77:2305-2315.
- Courjal F**, Cuny M, Simony-Lafontaine J, et al: Mapping of DNA amplifications at 15 chromosomal localizations in 1875 breast tumors: definition of phenotypic groups. *Cancer Res*. 1997, Oct 1; 57(19):4360-7.
- Courjal F**, Cuny M, Simony-Lafontaine J, Louason G, Speiser P, Zeillinger R, Rodriguez C, Theillet C: Mapping of DNA amplifications at 15 chromosomal localizations in 1875 breast tumors: definition of phenotypic groups. *Cancer Res*. 1997 Oct 1;57(19):4360-7.
- Dabiri GA**, Young CL, Rosenbloom J, Southwick FS: Molecular cloning of human macrophage capping protein cDNA. *J Biol Chem*. 1992, 267(23):16545-16552.
- Dahl E**, Sadr-Nabavi A, Klopocki E, et al.: Systematic identification and molecular characterisation of genes differentially expressed in breast and ovarian cancer. *J. Pathol*. 2005, 205:21-28.
- Datta SA**, Rao CM: Packing-induced conformational and functional changes in the subunits of α -crystallin. *J Biol Chem*. 2000, 275(52):41004-41010.
- Davidson MK**, Le Beau MM, Eddy RL et al.: Genetic mapping of the human polymeric immunoglobulin receptor gene to chromosome region 1q31-q41. *Cytogenet Cell Genet*. 1988, 48:107-111.
- Derham BK**, Harding JJ: α -crystallin as a molecular chaperone. *P Ret Eye Res*. 1999, 18(4):463-509.
- Diarra-Mehrpour M**, Sarafan N, Bourguignon J, Bonnet F, Bost F, Martin JP: Human inter- α -trypsin inhibitor heavy chain H3 gene. *J Biol Chem*. 1998, 273(41):26809-26819.
- Dickinson-Zimmer JS**, Voelker DR, Bernlohr DA, Murphy RC: Stabilization of leukotriene A4 by epithelial fatty acid-binding protein in the rat basophilic leukemia cell. *J Biol Chem*. 2004 Feb 27;279(9):7420-6. Epub 2003 Dec 15.
- Djabali K**, de Nechaud B, Landon F, Portier MM: α B-crystallin interacts with intermediate filaments in response to stress. *J Cell Sci*. 1997, 110:2759-2769.
- Durst M**, Glitz D, Schneider A, zur Hausen H: Human papillomavirus type 16 (HPV 16) gene expression and DNA replication in cervical neoplasia: analysis by in situ hybridization. *Virology*. 1992 Jul;189(1):132-40.
- Elston CW**, Ellis IO: Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. *Histopathology* 1991, 19:403-410.
- Farnsworth PN**, Singh K: Self-complementary motifs (SCM) in α -crystallin small heat shock proteins. *FEBS Letters*. 2000, 482:175-179.
- Ferlay J**, Bray F, Pisani P, Parkin DM: GLOBOCAN 2000: Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide, Version 1.0. IARC CancerBase No. 5 Lyon, IARC Press, 2001, <http://www-dep.iarc.fr/globocan/globocan.htm>
- Fidler IJ**, Radinsky R: Genetic control of cancer metastasis. *J Natl Cancer Inst*. 1990, 82; 166-168.
- Fisher B**, Costantino JP, Wickerham DL, et al: Tamoxifen for prevention of breast cancer: Report of the National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project P-1 Study. *J. Natl. Cancer Inst*. 1998, 90:1371– 1388.
- Franks LM**, Teich NM: Introduction to the Cellular and Molecular Biology of Cancer. Oxford University Press, Oxford, New York, Tokyo, 1997.
- Glockner S**, Lehmann U, Wilke N, Kleeberger W, Langer F, Kreipe H: Detection of gene amplification in intraductal and infiltrating breast cancer by laser-assisted microdissection and quantitative real-time PCR. *Pathobiology*. 2000, 68(4-5):173-9.
- Goeminne JC**, Guillaume T, Salmon M, Machiels JP, D'Hondt V, Symann M: Unreliability of carcinoembryonic antigen (CEA) reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) in detecting contaminating breast cancer cells in peripheral blood stem cells due to induction of CEA by growth factors. *Bone Marrow Transplantation*, 1999, 24:769- 775.
- Gopal-Srivastava R**, Haynes JJ, Piatigorsky J: Regulation of the murine α B-crystallin/small heat shock protein gene in cardiac muscle. *Mol. Cell. Biol*. 1995, 15(12):7081-7090.
- Hanahan D**, Weinberg RA: The hallmarks of cancer. *Cell*. 2000, Jan 7; 100(1):57-70.

Hayes DF: Breast cancer. In Skarin AT ed., Atlas of Diagnostic Oncology. New York: Gower Medical Publishing, 6.1-6.31.

Hayes DF: Breast Cancer. In: Skarin AT ed., Atlas of Diagnostic Oncology. New York: Gower Medical Publishing, 6.1-6.31 (1991).

Himmelfarb M, Klopocki E, Grube S, et al.: ITIH5, a novel member of the inter- α -trypsin inhibitor heavy chain family is downregulated in breast cancer. Cancer Letters. 2004, 204:69-77.

Hirai H, Izutsu K, Kurokawa M, Mitani K: Oncogenic mechanisms of Evi-1 protein. Cancer Chemother Pharmacol. 2001 Aug;48 Suppl 1:S35-40.

Hochuli E, Dobeli H, Schacher A: New metal chelate adsorbent selective for proteins and peptides containing neighbouring histidine residues. J Chromatogr. 1987 Dec 18;411:177-84.

Hochuli E: Purification of recombinant proteins with metal chelate adsorbent. Genet Eng (N Y). 1990;12:87-98.

Hofmann W, Schlag PM: BRCA1 and BRCA2--breast cancer susceptibility genes. J Cancer Res Clin Oncol. 2000, Sep;126(9):487-96.

Hoover HE, Thuerauf DJ, Martindale JJ, Glembotski CC: α B-crystallin gene induction and phosphorylation by MKK6-activated p38. J Biol Chem. 2000, 275(31):23825-23833.

HUSAR: <http://genome.dkfz-heidelberg.de/menu/biounit/>

Iwaki T, Kume-Iwaki A, Liem RKH, Goldman JE: α B-crystallin is expressed in non-lenticular tissues and accumulates in Alexanders disease brain. Cell, 1989, 57:71-78.

James LA, Mitchell EL, Menasce L, Varley JM: Comparative genomic hybridisation of ductal carcinoma in situ of the breast: identification of regions of DNA amplification and deletion in common with invasive breast carcinoma. Oncogene 1997, Mar 6; 14(9):1059-65.

Jeanpierre C, Austruy E, Delattre O, Jones C, Junien C: Subregional physical mapping of an α B-crystallin sequence and of expressed sequence D11S877E to human 11q. Mamm Genome. 1993, 4:104-108.

Jin GS, Kondo E, Miyake T, Shibata M, Takashima T, Liu YX, Hayashi K, Akagi T, Yoshino T: Expression and intracellular localization of FKHRL1 in mammary gland neoplasms. Acta Med Okayama. 2004 Aug;58(4):197-205.

Jing C, Beesley C, Foster CS, Chen H, Rudland PS, West DC, Fujii H, Smith PH, Ke Y: Human cutaneous fatty acid-binding protein induces metastasis by up-regulating the expression of vascular endothelial growth factor gene in rat Rama 37 model cells. Cancer Res. 2001 Jun 1;61(11):4357-64.

Jing C, Beesley C, Foster CS, et al.: Human cutaneous fatty acid-binding protein induces metastasis by up-regulating the expression of vascular endothelial growth factor gene in rat rama 37 model cells. Cancer Res. 2001, 61:4357-4364.

Jing C, Beesley C, Foster CS, et al.: Identification of the messenger RNA for human cutaneous fatty acid-binding protein as metastasis inducer. Cancer Res. 2000, 60:2390-2398.

Jing C, Beesley C, Foster CS, Rudland PS, Fujii H, Chen HJ, Smith P, Ke, Y: Identification of the mRNA for human cutaneous fatty acid-binding protein as a metastasis-inducer. Cancer Res., 60: 2390–2398, 2000.

Johansen FE, Bosloven BA, Krajči P, Brandtzaeg P: A composite DNA element in the promoter of the polymeric immunoglobulin receptor regulates its constitutive expression. Eur J Immunol. 1998, 28:1161-1171.

Kamik P, Paris M, Williams BR, Casey G, Crowe J, Chen P: Two distinct tumor suppressor loci within chromosome 11p15 implicated in breast cancer progression and metastasis. Hum Mol Genet. 1998, May; 7(5):895-903.

Kamradt MC, Chen F, Cryns VL: The small heat shock protein α B-crystallin negatively regulates cytochrome c- and caspase-8-dependent activation of caspase-3 by inhibiting its autoprolytic maturation. J Biol Chem. 2001, 276(19):16059-16063.

Kato K, Ito H, Inaguma Y, Okamoto K, Saga S: Synthesis and accumulation of α B-crystallin in C6 glioma cells is induced by agents that promote the disassembly of microtubules. J Biol Chem. 1996, 271:26989-26994.

Keen JC, Davidson NE: The biology of breast carcinoma. Cancer. 2003 Feb 1;97(3 Suppl):825-33.

- Kenemans P**, Verstraeten RA, Verheijen RH: Oncogenic pathways in hereditary and sporadic breast cancer. *Maturitas*. 2004, Sep 24;49(1):34-43.
- Klemenz R**, Fröhli E, Steiger RH, Schäfer R, Aoyama A: α B-crystallin is a small heat shock protein. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1991, 88:3652-3656.
- Knudson AG**: Antioncogenes and human cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993, Dec 1;90(23):10914-21.
- Kobayashi H**, Gotho J, Hirashima Y, Terao T: Inter- α -trypsin inhibitor bound to tumor cells is cleaved into the heavy chains and the light chain on the cell surface. *J Biol Chem*. 1996 271(19):11362-11367.
- Kobayashi H**, Wei Sun G, Terao T: Immunolocalization of hyaluronic acid and inter-alpha-trypsin inhibitor in mice. *Cell Tissue Res*. 1999, 296:587-597.
- Krajči P**, Grzeschik KH, Geurts van Kessel AHM, Olaisen B, Brandtzaeg P: The human transmembrane secretory component (poly-Ig receptor): molecular cloning, restriction fragment polymorphism and chromosomal sublocalisation. *Hum Genet*. 1991, 87:642-648.
- Krajči P**, Solberg R, Sandberg M, Øyen O, Jahnsen T, Brandtzaeg P: Molecular cloning of the human transmembrane secretory component (poly-Ig receptor) and its mRNA expression in human tissues. *Biochem Biophys Res Comm*. 1989, 158(3):783-789.
- Laake K**, Odegard A, Andersen TI, et al: Loss of heterozygosity at 11 q23.1 in breast carcinomas: indication for involvement of a gene distal and close to ATM. *Genes Chromosomes Cancer*. 1997, Mar; 18(3):175-80.
- Laemmli UK**: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970 Aug 15;227(5259):680-5.
- Lemoine NR**: Molecular advances in pancreatic cancer. *Digestion*. 1997, 58:550.
- Lennon G**, Auffray C, Polymeropoulos M, Soares MB: The I.M.A.G.E. consortium: An integrated molecular analysis of genomes and their expression. *Genomics* 1996, 33:151-152.
- Lichy JH**, Zavar M, Tsai MM, O'Leary TJ, Taubenberger JK: Loss of heterozygosity on chromosome 11p15 during histological progression in microdissected ductal carcinoma. *Am J Pathol*. 1998 Jul;153(1):271-8.
- Loeb LA**: Cancer cells exhibit a mutator phenotype. *Adv Cancer Res*. 1998, 72:25.
- Luton F**, Cardone MH, Zhang M, Mostov KE: Role of tyrosine phosphorylation of transcytosis of the polymeric Ig receptor. *Mol Biol Cell*. 1998, 9:1787-1802.
- Luton F**, Mostov KE: Transduction of basolateral-to-apical signals across epithelial cells: ligand-stimulated transcytosis of the polymeric immunoglobulin receptor requires two signals. *Mol Biol Cell*. 1999, 10:1409-1427.
- Masouyé I**, Hagens G, van Kuppevelt TH, et al.: Endothelial cells of the human microvasculature express epidermal fatty acid-binding protein. *Circ. Res*. 1997, 81:297-303.
- Masouyé I**, Hagens G, Van Kuppevelt TH, Madsen P, Saurat JH, Veerkamp JH, Pepper MS, Siegenthaler G: Endothelial cells of the human microvasculature express epidermal fatty acid-binding protein. *Circ Res*. 1997 Sep;81(3):297-303.
- Mehra R**, Varambally S, Ding L, Shen R, Sabel MS, Ghosh D, Chinnaiyan AM, Kleer CG: Identification of GATA3 as a breast cancer prognostic marker by global gene expression meta-analysis. *Cancer Res*. 2005 Dec 15;65(24):11259-64.
- Mielnicki LM**, Ying AM, Head KL, Asch HL, Asch BB: Epigenetic regulation of gelsolin expression in human breast cancer cells. *Experi. Cell Res*. 1999, 249:161-176.
- Miller FR**: Xenograft models of premalignant breast disease. *Mammary Gland Biol Neoplasia*. 2000 Oct;5(4):379-91.
- Mitelman F**, Johansson B, Mandahl N, Mertens F: Clinical significance of cytogenetic findings in solid tumors. *Cancer Genet Cytogenet*. 1997, May; 95(1):1-8.
- Nayfield SG**, Karp JE, Ford LG, Dorr FA, Kramer BS: Potential role of tamoxifen in prevention of breast cancer. *J. Natl. Cancer Inst*. 1991, 83:1450-1459.
- Ngo JT**, Klisak I, Dubin RA et al.: Assignment of the α B-crystallin gene to human chromosome 11. *Genomics*, 1989, 5:665-669.

- Noël A**, Foidart JM: The Role of Stroma in Breast Carcinoma Growth In Vivo. *J. Mam Gland Biol Neoplasia*. 1998, Apr;3(2):215-25.
- Nowell PC**: The clonal evolution of tumor cell populations. *Science*. 1976, 194:23.
- Ogihara T**, Isobe T, Ichimura T, Taoka M, Funaki M, Sakoda H, Onishi Y, Inukai K, Anai M, Fukushima Y, Kikuchi M, Yazaki Y, Oka Y, Asano T: 14-3-3 protein binds to insulin receptor substrate-1, one of the binding sites of which is in the phosphotyrosine binding domain. *J Biol Chem*. 1997 Oct 3;272(40):25267-74.
- Olayioye M**, Neve R, Lane H, Hynes N: The ErbB signaling network: receptor heterodimerization in development and cancer. *EMBO J*. 2000, 19:3158–3167.
- Paris S**, Sesboue R, Delpech B, et al.: Inhibition of tumor growth and metastatic spreading by overexpression of inter-alpha-trypsin inhibitor family chains. *Int. J. Cancer*. 2002, 97:615-620.
- Patel U**, Grundfest-Broniatowski S, Gupta M, Banerjee S: Microsatellite instabilities at five chromosomes in primary breast tumors. *Oncogene*. 1994, Dec; 9(12):3695-700.
- PathoPic**: Dr. med. Katharina Glatz-Krieger, Institut für Pathologie, Basel, Dr. Dieter Glatz-Krieger, Universitätsrechenzentrum, Basel, <http://alf3.urz.unibas.ch/pathopic/srch-f-thu.cfm>.
- Piskurich JF**, France JA, Tamer CM, Willmer CA, Kaetzel CS, Kaetzel DM: Interferon- γ induced polymeric immunoglobulin receptor mRNA in human intestinal epithelial cells by a protein synthesis dependent mechanism. *Mol Immunology*. 1993, 30(4):413-421.
- Plummer SJ**, Paris MJ, Myles J, Tubbs R, Crowe J, Casey G: Four regions of allelic imbalance on 17q12-qter associated with high-grade breast tumors. *Genes Chromosomes Cancer*. 1997, Dec; 20(4):354-62.
- Powell DW**, Rane MJ, Chen Q, Singh S, McLeish KR: Identification of 14-3-3zeta as a protein kinase B/Akt substrate. *J Biol Chem*. 2002 Jun 14;277(24):21639-42.
- Rabbits TH**: Chromosomal translocations in human cancer. *Nature*. 1994, Nov 10; 372(6502):143-9.
- Reinholz MM**, An MW, Johnsen SA, Subramaniam M, Suman VJ, Ingle JN, Roche PC, Spelsberg TC: Differential gene expression of TGF beta inducible early gene (TIEG), Smad7, Smad2 and Bard1 in normal and malignant breast tissue. *Breast Cancer Res Treat*. 2004 Jul;86(1):75-88.
- Reuter S**, Bartelmann M, Vogt M, et al.: APM-1, a novel human gene, identified by aberrant co-transcription with papillomavirus oncogenes in a cervical carcinoma cell line, encodes a BTB/POZ-zinc finger protein with growth inhibitory activity. *EMBO J*. 1998, 17(1):215-222.
- Romano G**: The role of adult stem cells in carcinogenesis. *Drug News Perspect*. 2005 Nov;18(9):555-9.
- Rosenquist M**: 14-3-3 proteins in apoptosis. *Braz Med Biol Res*. 2003, 36:403-408.
- Rotor-Gene** 2000/3000 Real-Time Amplification Operator's Manual (German) Version 5.0.47
- Russo J**, Yang X, Hu YF, et al: Biological and molecular basis of human breast cancer. *Frontiers in Bioscience*. 1998, 3; 944-960, Sep 1.
- Salier JP**, Rouet P, Raguenes G, Daveau M: The inter- α -inhibitor family: from structure to regulation. *Biochem. J*. 1996, 315:1-9.
- Sarkar J**, Gangopadhyay NN, Moldoveanu Z, Mestcky J, Stephensen CB: Vitamin A is required for regulation of polymeric immunoglobulin receptor (pIgR) expression by interleukin-4 and interferon- γ in a human intestinal epithelial cell line. *J Nutr*. 1998, 128:1063-1069.
- Schmitt A**, Specht T, Beckmann G, et al.: Exhaustive mining of EST libraries for genes differentially expressed in normal and tumour tissues. *Nucleic Acids Res*. 1999, 27:4251-4260
- Schmutzler RK**, Fimmers R, Bierhoff E, et al: Association of allelic losses on human chromosomal arms 11 Q and 16Q in sporadic breast cancer. *Int J Cancer*. 1996, Aug 22; 69(4):307-11.
- Seluja GA**, Elias L, Pietromonaco SF: Two unique 5' untranslated regions in mRNAs encoding human 14-3-3 ζ : differential expression in hemopoietic cells. *Biochim Biophys Act*. 1998, 1395:281-287.
- Shen Q**, Brown PH: Novel agents for the prevention of breast cancer: targeting transcription factors and signal transduction pathways. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*. 2003 Jan;8(1):45-73.

- Shpitz, B**, Zimlichman S, Zemer R, et al: Telomerase activity in ductal carcinoma in situ of the breast. *Breast Cancer Res. Treat.* 1999, 58:65-69.
- Sinclair CS**, Rowley M, Naderi A, Couch FJ: The 17q23 amplicon and breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 2003 Apr;78(3):313-22.
- Solorzano-Vargas RS**, Wang J, Jiang L, et al.: Multiple transcription factors in 5'-flanking region of human polymeric immunoglobulin receptor control its basal expression. *Am J Gastrointest Liver Physiol.* 2002, 283:415-425.
- Song W**, Bomsel M, Casanova J, Vaerman JP, Mostov K: Stimulation of transcytosis of the Polymeric Immunoglobulin Receptor by dimeric IgA. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1994, 91:163-166.
- Southwick FS**: Gain-of-function mutations conferring actin-severing activity to macrophage capping Cap G. *J Biol Chem.* 1995, 270(1):45-48.
- Stampfer MR**, Yaswen P: Culture Models of Human Mammary Epithelial Cell Transformation. *J. Mam. Gland Biol. Neoplasia.* 2000, Vol. 5, No. 4.
- Storch J**, Thumser AEA: The fatty acid transport function of fatty acid-binding proteins. *Biochim Biophys Act.* 2000, 1486:28-44.
- Sun HQ**, Kwaitkowska K, Wooten DC, Yin HL: Effects of CapG overexpression on Agonist-induced motility and second messenger generation. *J Cell Biol.* 1995, 129(1):147-156.
- Sun HQ**, Lin KM, Yin HL: Gelsolin modulates phospholipase C activity in vivo through phospholipid binding. *J Cell Biol.* 1997;138(4):811-820.
- Takenouchi-Ohkubo N**, Takahashi T, Tsuchiya M, Mestecky J, Moldoveanu, Moro I.: Role of nuclear factor- κ B in the expression by tumor necrosis factor- α of the human polymeric immunoglobulin receptor (pIgR) gene. *Immunogenetics.* 2000, 51:289-295.
- Tamm ER**, Russell P, Johnson DH, Piatigorski J: Human and monkey trabecular meshwork accumulate α B-crystallin in response to heat shock and oxidative stress. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1996, 37:2402-2413.
- The ProDom database** <http://protein.toulouse.inra.fr/prodom/current/cgi-bin/ProDomBlast3.pl>
- Tomlinson I**, Bodmer W: Selection, the mutation rate and cancer: ensuring that the tail does not wag the dog. *Nat Med.* 1999, Jan; 5(1):11-2.
- UICC**: TNM Classification of Malignant Tumours. Sobin LH and Wittekind CH (eds.). 5th ed. Wiley-Liss, Inc., New York 1997.
- Vandesompele J**, De Paepe A, Speleman F: Elimination of primerdimer artifacts and genomic coamplification using a two-step SYBR green I real-time RT-PCR. *Anal Biochem.* 2002, 303:95-98.
- Vandesompele J**, Katleen DP, Filip P, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, Speleman F: Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biology.* 2002, 3:34.1-34.11; geNorm V3.3: <http://allserv.ugent.be/~jvdesomp/genorm/>
- Veerkamp JH**, Maatman RG: Cytoplasmic fatty acid-binding proteins: their structure and genes. *Prog Lipid Res.* 1995;34(1):17-52.
- Vogelstein B**, Kinzler KW: The multistep nature of cancer. *Trends Genet.* 1993, Apr; 9(4):138-41.
- Wasserman L**, Dreilinger A, Easter D, Wallace A: A Seminested RT-PCR Assay for HER2/neu: Initial Validation of a New Method for the Detection of Disseminated Breast Cancer Cells. *Molecular Diagnosis.* 1999, 4(1):21-28.
- Witke W**, Li W, Kwaitkowska K, Southwick FS: Comparisons of CapG and gelsolin-null macrophages: demonstration of a unique role for CapG in receptor-mediated ruffling, phagocytosis, and vesicle rocketing. *J Cell Biol.* 2001, 154(4):775-784.
- Wolffe AP**, Urnov FD, Guschin D: Corepressor complexes and remodeling chromatin for repression. *Biochem. Soc. Trans.* 2000, 28:379-386.
- Yaffe MB**: How do 14-3-3 proteins work? – Gatekeeper phosphorylation and the molecular anvil hypothesis. *FEBS Letters.* 2002, 513:53-57.

Yano T, Teruya K, Shirahata S, Watanabe J, Osada K, Tachibana H, Ohashi H, Kim EH, Murakami H: Ras oncogene enhances the production of a recombinant protein regulated by the cytomegalovirus promoter in BHK-21 cells. *Cytotechnology*. 1994, 16(3):167-78.

Young CL, Feierstein A, Southwick FS: Calcium regulation of actin filament capping and monomer binding by macrophage capping protein. *J Biol Chem*. 1994, 269(19):13997-14002.

Yu FX, Johnston PA, Sudhof TC, Yin HL: gCap39, a calcium ion- and polyphosphoinositide-regulated actin capping protein. *Science*, 1990, 250:1413-1415.

Zannis-Hadjopoulos M, Novac O, Alvarez D, Price GB: 14-3-3s are DNA-replication proteins. *Biochem Soc Trans*. 2002, 30(4):397-400.

Zimmerman AW, van Moerkerk HTB, Veerkamp JH: Ligand specificity and conformational stability of human fatty acid-binding proteins. *Int J Biochem Cell Biol*. 2001, 33:865-876.

Zupan LA, Steffens DL, Berry CA, Landt M, Gross RW: Cloning and expression of a human 14-3-3 protein mediating phospholipolysis. *J Biol Chem*. 1992, 267(13):8707-8710.

5.5 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all denen bedanken, die mir die Anfertigung dieser Arbeit ermöglicht und mich bei ihrer Ausführung unterstützt haben.

An erster Stelle danke ich Herrn Prof. Dr. rer. nat. M. Dürst, der das Thema bereitstellte und mich über die Jahre hinweg mit allen Höhen und Tiefen betreute und unterstützte. Er vermittelte mir den nötigen wissenschaftlichen Hintergrund zur Bearbeitung dieses Themas und hatte stets Zeit für eine Diskussion der Ergebnisse und des weiteren Vorgehens.

Desweiteren möchte ich Prof. Dr. Günter Theißen bedanken, der es mir als betreuender Hochschullehrer ermöglichte, diese Arbeit an einer klinischen Forschergruppe anzufertigen.

Ein großer Dank gilt natürlich allen Mitgliedern der klinischen Forschergruppe „Gynäkologische Molekularbiologie“ für das stets sehr gute Arbeitsklima und ihre Geduld. Im Besonderen danke ich Birgit Meyer und Bettina Rudolph für ihre Diskussionsbereitschaft bei wissenschaftlichen Problemen und die Durchsicht des Manuskripts. Katrin Beer und Karin Teller danke ich für ihre Hilfe bei kleinen Problemen des Laboralltags. Lars Jansen danke ich besonders für die Unterstützung bei den vielen RNA-RNA-*in situ*-Hybridisierungen.

Auch bei meiner Freundin Daniela Haase möchte ich mich für die vielen kritischen und hilfreichen Diskussionen und die Durchsicht des Manuskripts bedanken.

Nicht zuletzt danke ich meiner Familie für ihre ständige moralische Unterstützung und die Förderung meines Studiums. Ohne euch wäre ich nicht so weit gekommen.

Herzlichen Dank!

5.6 Lebenslauf

Grube, Susanne
Camsdorfer Ufer 9
07749 Jena
Tel.: 03641/357390
geboren am 16. 11. 1975 in Karl-Marx-Stadt
Familienstand: verheiratet, ein Kind

Schulbildung

09/82 – 06/92 Mittelschule, Valentina-Tereschkowa-Oberschule in Karl-Marx-Stadt
08/92 – 06/94 Dr. Wilhelm-André-Gymnasium in Chemnitz
Abschluß: Allgemeine Hochschulreife, Gesamtnote: gut (2,2)

Hochschulstudium

10/94 – 01/00 Biologiestudium an der Friedrich-Schiller-Universität Jena
Studienschwerpunkte: Mikrobiologie, Medizinische Mikrobiologie, Biochemie
12/98 – 01/00 Diplomarbeit am Hans-Knöll-Institut für Naturstoffforschung in Jena,
Abteilung Mikrobielle Infektionsbiologie, Arbeitsgruppe Mykologie
Thema: „Isolierung und Charakterisierung eines Phosphatidylinositol-Kinase
homologen Gens der humanpathogenen Hefe *Candida albicans*“
Abschluß: Diplombiologin, Gesamtnote: gut (2,4)
Seit 02/00 Doktorandin in der Klinischen Forschergruppe „Gynäkologische
Molekularbiologie“ in der Klinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe der
FSU Jena
Thema: „Expressionsanalyse neuer putativer Onkogene und Tumorsuppressor-
gene in Mammakarzinomen und deren Auswirkung auf Zellen in Kultur nach
ektopischer Expression von cDNA“

5.7 Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die Dissertation selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen angefertigt habe. Ich habe nicht die Hilfe eines Promotionsberaters in Anspruch genommen. Dritte haben weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.

Ich erkläre, dass ich mich mit der vorliegenden Arbeit an keiner anderen Hochschule um den akademischen Grad *Doctor rerum naturalium* beworben habe und dass ich weder früher noch gegenwärtig die Eröffnung eines Verfahrens zum Erwerb des oben genannten akademischen Grades an einer anderen Hochschule beantragt habe.

Die geltende Promotionsordnung der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät der FSU Jena ist mir bekannt.

Jena, den 21. 04. 2006

Susanne Grube